
Aus der Kinder- und Jugendklinik der Universitätsmedizin Rostock

Direktor (k): Prof. Dr. med. J. Däbritz

**Interpretation eines komplexen genetischen Befundes mit
Blick auf die neurologische und klinische Symptomatik:
*der Fall F.H.***

Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Nina-Marie Daas, geb. Schoepke

geboren am 24.08.1991 in Kiel

Schwentinental, September 2019

Dekan: Prof. Dr. med. E. C. Reisinger

Jahr der Einreichung: September 2019

Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.2020

1. Gutachter: Prof. Dr. D.-C. Fischer, Kinder- und Jugendklinik, Universität Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. Timo Kirschstein, Oscar Langendorff Institut für Physiologie, Universität Rostock
3. Gutachter: PD Dr. Jonas Denecke, Pädiatrische Neurologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Inhaltsverzeichnis

I	Verzeichnis der Tabellen	I
II	Verzeichnis der Abbildungen	II
III	Verzeichnis zum Anhang	IV
IV	Abkürzungsverzeichnis	V
1	Einleitung und Ziel der Arbeit	1
2	Vorstellung des Patienten F.H.	3
2.1	Phänotypische Auffälligkeiten von F.H. bei Erstvorstellung und im Verlauf	3
2.2	Ergebnisse der klinisch-chemischen und apparativen Diagnostik sowie der Entwicklungsdiagnostik und der genetischen Analyse	7
3	Bedeutung der genetischen Befunde von F.H.	11
3.1	Der Ras/MAP-Kinase Signalweg	11
3.2	Die RAF-Gene	13
3.2.1	Aufbau, Funktion und Struktur der RAF-Proteine	13
3.2.2	Onkogene Mutationen in B-RAF	16
3.3	Rasopathien und syndromale Erkrankungen	17
3.3.1	Die bei F.H. beschriebene Mutation auf Chromosom 7	18
3.3.2	Das Cardiofaciocutane-Syndrom	19
3.3.3	Das Noonan-Syndrom	20
3.3.4	Das Costello-Syndrom	21
3.3.5	Das Leopard-Syndrom	22
3.4	Mutationen auf den Chromosomen 4 und 11	22
3.4.1	Mutationen auf Chromosom 4	22
3.4.2	Mutationen auf Chromosom 11	24
3.4.2.1	Die Geruchsrezeptorgene OR52K2 und OR52K1	25
3.4.2.2	Regulation von Entzündung und Immunabwehr durch TRIM 21	26
4	Durchführung und Ergebnisse der ex-vivo Untersuchungen zur Funktion von Interleukin-6 und zur Konzentration des Apoptosemarkers M30	28
4.1	Verwendete Substanzen und Lösungen	28
4.2	Isolierung und Kurzzeitkultivierung von Peripheral Blood Mononuclear Cells	28
4.3	Stimulation der PBMC mit Lipopolysacchariden	29
4.4	Bestimmung von Interleukin-6 mit einem ELISA in Zellkulturüberständen	29
4.5	Bestimmung des Apoptosemarkers M30	30
4.6	Ergebnisse der ex-vivo Untersuchungen	31
4.6.1	Freisetzung von IL-6 aus kultivierten PBMCs nach Stimulation mit LPS	31

4.6.2	Quantitative Bestimmung des Apoptosemarkers M-30 im Plasma	31
5	Diskussion	32
5.1	Ethische und Philosophische Überlegungen zum Umgang mit diagnostischen Befunden	36
5.2	Schlussfolgerung und Ausblick	38
6	Zusammenfassung	40
7	Thesen der Dissertation	41
8	Literaturverzeichnis	42
9	Anhang	46
10	Lebenslauf	54

I Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1:	Auffälligkeiten während Schwangerschaft, Geburt und Neugeborenenperiode (Perzentilen aus (Fenton & Kim, 2013))	6
Tab. 2:	Zusammenfassung der Befunde im MRT und EEG	8
Tab. 3:	Übersicht über die <i>RAF</i> -Gene und -Proteine	13
Tab. 4:	Struktur und Lage funktionell entscheidender Regionen im B-RAF Protein (aus (Roskoski, 2010))	15
Tab. 5:	Position der bei F.H. (farblich hervorgehoben) und in der Literatur beschriebenen B-RAF-Mutationen bei Patienten mit Noonan-, Cardiofaciocutaneous- und Leopard-Syndrom (Niihori et al., 2006), (http://www.omim.org/entry/164757#0012), (Sarkozy et al., 2009), (Schulz et al., 2008)	33

II Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1:	Ausschnitt aus dem genetischen Befund des Instituts für Humangenetik und Molekularpathologie Rostock	1
Abb. 2:	Übersicht der morphologischen Auffälligkeiten von F.H.	4
Abb. 3:	Die somatische Entwicklung von F.H. innerhalb der ersten 24 Monate. Die Entwicklung von Kopfumfang (A), Körpergewicht (B) und Körperlänge (C) sind als rote Linie in die Diagramme eingezeichnet.	5
Abb. 4:	Relevante Ausschnitte der MRT-Aufnahmen von F.H. im Alter von 21 Monaten (A, E) und 49 Monaten (B, C, D und F)	7
Abb. 5:	Schematische Darstellung der Rolle der RAF-Proteine in der Signalübertragung (modifiziert nach (Lavoie & Therrien, 2015)	12
Abb. 6:	Schematische Darstellung der Genstruktur (A) und des B-RAF Proteins (B) mit den funktionellen Domänen (Domingo & Schwartz, 2011)	14
Abb. 7:	Lage des bei F.H. betroffenen Bereiches auf Chromosom 7 (Pubmed Gene ID BRAF 673)	18
Abb. 8:	Lage des betroffenen Bereiches auf Chromosom 4 (Pubmed Gene ID MIR1973 401152)	23
Abb. 9:	Schematische Darstellung der Funktion der microRNAs (He & Hannon, 2004)	24
Abb. 10:	Lage des bei F.H. betroffenen Bereiches auf Chromosom 11 (aus Pubmed Gene ID TRIM21 6737)	25
Abb. 11:	Die Rolle von TRIM21 bei der intrazellulären Eliminierung von Pathogenen (Geijtenbeek & Gringhuis, 2013)	27
Abb. 12:	Zeit- und Dosisabhängigkeit der Freisetzung von IL-6 aus kultivierten PBMC bei gesunden Probanden (A, B) und bei F.H. (C)	31
Abb. 13:	Lage der Mutation von F.H. in Beziehung zu anderen häufigen, mit menschlichen Erkrankungen verbundenen Mutationen in B-RAF (Tartaglia & Gelb, 2010)	32

Abb. 14: Phänotypische Veränderungen im Kopf- und Gesichtsbereich von Patienten mit einem CFC-Syndrom (modifiziert nach (Pierpont et al., 2014; Schulz et al., 2008)

III Verzeichnis zum Anhang

Anhang 1: Vergleich phäno- und genotypischer Merkmale mit den für F.H. in Frage kommenden Syndromen	46
Anhang 2: Angaben zu <i>B-RAF</i> Mutationen für NS, LS und CFCS aus der Literatur (aus (Niihori et al., 2006), (http://www.omim.org/entry/164757#0012), (Sarkozy et al., 2009), (Schulz et al., 2008))	49
Anhang 3: In PubMed beschriebene Mutationen Stand: 10/2017	51

IV Abkürzungsverzeichnis

Akt	Aktivierungskinas
AP-1	Aktivator Protein 1, (Transkriptionsfaktor)
ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
BAD	Bcl-2 Antagonist of cell death
BAG-1	BCL2 associated athanogene 1, (Onkogen)
BCL2	B-cell lymphoma Protein
BERA	Brainstem evoked response audiometry
BSA	Bovines Serumalbumin
CBL	Casitas B-lineage Lymphoma, (E3 ubiquitin-protein Ligase)
CCL4	CC-Chemokine Ligand 4
CFC	Cardiofaciocutaneous-Syndrom
c-myc	Nach der Krankheit Myelocytomatose, (Onkogen)
CNG	Cyclic nucleotide-gated channel
CR1,2,3	Conserved region 1,2,3
CRD	Cystin-reiche Domäne
CREB	CAMP response element-binding protein
CXCL10	CXC-motif chemokine 10
EGF	Epidermal growth factor
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
FGF	Fibroblast Growth Factor
FKS	Fetales Kälberserum
FLAIR	Fluid attenuated inversion recovery, (MRT-Sequenz)
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
GRB2	Growth factor receptor bound protein 2
Gs-Protein	Stimulierendes Guanosintriphosphat-bindendes Protein
HRAS	GTPase
ICB	Intrazerebrale Blutung
IGF	Insulin-like growth factor
I κ B	Inhibitor von NF κ B
IL	Interleukin
IRF	Interferon regulatory factor
KRAS	Kirsten rat sarcoma virus, (Proto-Onkogen)
LPS	Lipopolysaccharide
LS	Leopard Syndrom
MAP	Mitogen-activated protein
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
mdm2	Mouse double minute 2 homolog, (E3 ubiquitin-protein Ligase)

MEK	MAP/ERK Kinase
MHC	Major Histocompatibility complex
miRNA	Mikro Ribonukleinsäure
MNV	Multiple nucleotide variation
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
NFκB	Nuclear factor kappa B
NRAS	Neuroblastoma viral oncogen
NS	Noonan-Syndrom
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PBL	peripheral blood lymphocytes
PBS	Phosphate Buffered Saline
PKD	Phosphokinasedomäne
PP2A	Proteinphosphatase-2A
pre-miRNA	Vorläufer mikro Ribonukleinsäure
PTPN11/SHP-2	Protein Tyrosin Phosphatase
Ras	Rat sarcoma Proto-Onkogen
RISC	RNA-induced silencing Komplex
RIT	Ras-like Protein
RPMI-1640	Zellkulturmedium nach Roswell Park Memorial Institute
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SHOC2	Leucine-rich repeat protein, (Positiver Regulator des Ras-Mapk-Signalwegs)
SHP2	Src Homology Phosphatase 2, (protein-tyrosine Phosphatase)
SNV	Single-nucleotide variants
SOS1	Son of sevenless homolog 1, (GTP Adapterprotein)
SS-A	Sjögren-Syndrom-Antikörper, (Antinukleärer Autoantikörper)
TEOAE	Transitorisch evozierte otoakustische Emissionen
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TPO-Ak	Thyreoperoxidase-Antikörper
TRIM21/(Ro-52)	Tripartite motif-containing protein 21, (E3-ubiquitin Ligase)

1 Einleitung und Ziel der Arbeit

Eine „Syndromale Erkrankung“ ist durch eine charakteristische Kombination verschiedener morphologischer Auffälligkeiten oder Symptome, deren Entstehung und Entwicklung zunächst unbekannt sind, gekennzeichnet. Im Unterschied zu monogenetischen Erkrankungen, wie zum Beispiel der Cystischen Fibrose, sind syndromale Erkrankungen in der Regel polygenetisch bedingt und die Zuordnung von Mutation und Symptom ist meist schwierig. Symptomkonstellationen, die mit einer charakteristischen Morphologie einhergehen, können häufig schon von Laien einer Gruppe zugeordnet und benannt werden. Diese ist zum Beispiel bei der Trisomie 21 (Down Syndrom), umgangssprachlich Mongolismus, der Fall. Hier werden die Patienten aufgrund der charakteristischen Augenform erkannt. Anders ist es bei Patienten mit subtilen morphologischen Auffälligkeiten und gegebenenfalls sogar fehlender relevanter klinischer Symptomatik. Hier ist eine „Blickdiagnose“ so gut wie unmöglich.

Im Zentrum dieser Arbeit steht der Patient F.H., der bei der Geburt durch äußere Stigmata und im Verlauf mit einer verzögerten Entwicklung aufgefallen ist und mit dem Verdacht einer syndromalen Erkrankung in der Kinder- und Jugendklinik der UMR vorgestellt wurde. Die genetische Untersuchung führte zu dem in Abb. 1 dargestellten Ergebnis mit der Diagnose einer Rasopathie, brachte allerdings keine Klarheit hinsichtlich der "Krankheitsursache" bzw. der syndromalen Zuordnung.

"Im ChAS Browser wurden zwei Kopienzahl-Veränderungen mit zunächst unklarer Relevanz angezeigt:

- 1.) Eine Duplikation auf Chromosom 4q26 von etwa 500kb (Position 116914594-117414663bp, hg19). Die Region enthält keine annotierten RefSeq Gene. In der Decipher-Datenbank und in der Fachliteratur sind keine vergleichbaren Duplikationen beschrieben. Bei gesunden Probanden (DGV-Datenbank) finden sich aber ebenfalls keine vergleichbaren Einträge.
- 2.) Eine Deletion auf Chromosom 11p5.4 von etwa 130kb (Position 4370854-4499600bp, hg19). Die Region enthält 3 RefSeq Gene (OR52B4, OR52K2, TRIM21), die in der Fachliteratur bisher keine Assoziation zu Entwicklungsverzögerungen zeigen. In der Decipher-Datenbank gibt es keinen vergleichbaren Fall. Bei gesunden Probanden (DGV-Datenbank) sind vergleichbare Deletionen beschrieben.

Bei der molekulargenetischen Untersuchung des BRAF-Gens wurde im Exon 11 die bisher nicht bekannte Mutation c.1399_1407del im heterozygoten Zustand nachgewiesen. Es handelt sich dabei um den Verlust (=Deletion) von 9 Nukleotiden."

Abb. 1: Ausschnitt aus dem genetischen Befund des Instituts für Humangenetik und Molekularpathologie Rostock

Rasopathien sind seltene und zudem komplexe Erkrankungen und das Cardiofaciocutaneous (CFC)-Syndrom, das Noonan-Syndrom, das Costello-Syndrom und das Leopard-Syndrom werden mit Mutationen des BRAF-Gens in ursächliche Verbindung gebracht.

Ziele der vorliegenden Arbeit waren

- einen Überblick über die Rasopathien zu erarbeiten und – so weit möglich – die bei F.H. beschriebenen Auffälligkeiten und klinischen Symptome anhand der Literaturangaben zu bewerten.
- die Erfassung der somatischen und kognitiven Entwicklung von F.H. in den ersten Lebensjahren anhand der in der Krankenakte dokumentierten Befunde sowie durch eigene Untersuchungen und Gespräche mit den Eltern.
- an isolierten Lymphozyten von F.H. zu überprüfen, ob die Mutation des *TRIM21* Auswirkungen auf die Freisetzung von Interleukin-6 hat.
- eine Blutprobe auf M30 als Marker einer gesteigerten Apoptose zu testen.

Daher wird im Anschluss an die Vorstellung des Patienten F.H. zunächst ein Überblick über die physiologische Bedeutung des Ras/MAP-Kinase Signalwegs und die durch Mutation entstehenden Rasopathien gegeben. Weiterhin wird die physiologische Rolle der übrigen, bei F.H. von Mutationen betroffenen Gene, dargestellt.

2 Vorstellung des Patienten F.H.

Die Eltern haben der Aufarbeitung der Krankenakte und der Verwendung der Befunde und Bilder im Rahmen der Dissertation und Publikation zugestimmt und in mehreren Gesprächen auch außerhalb der Sprechstunden über die Entwicklung von F.H. berichtet. Auch die Ethikkommission hat keine Bedenken gegenüber dieser Arbeit geäußert. Die Befunde wurden aus der Patientenakte entnommen und/oder in Gesprächen mit den Angehörigen erhoben.

2.1 Phänotypische Auffälligkeiten von F.H. bei Erstvorstellung und im Verlauf

Zu den postnatalen phänotypischen Auffälligkeiten von F.H. gehörten Anomalien der Kopfform im Sinne eines Plagio-Skaphocephalus mit einem einseitig links abgeflachten Hinterkopf, einer hohen Stirn, leichten biparietalen Impressionen sowie ein Mikrozephalus (Abb. 2). Bereits direkt nach der Geburt fiel eine erhöhte Nackenfaltendicke (Pterygium colli li > re), ein breiter Hals und ein breiter Nasenrücken auf. Die Körperform ist eher gedrungen mit einem kurzen Thorax, einer Trichterbrust, einem leicht hypotonen Muskeltonus, verkürzten Röhrenknochen (Femur < Humerus < Ulna), fleischigen Händen und Füßen und einer Vierfingerfurche rechts sowie einer angedeutete Sandalenlücke.

Auch im Bereich der Haare fielen im Verlauf Veränderungen auf. F.H. zeigte eine lokale Alopezie bei allgemein eher langsam wachsenden Haaren. Die Oberfläche der Haut war an den Extremitäten und der Brust sowie im Gesicht eher trocken und schuppig (Hyperkeratose) mit einer klaren Grenze zur normalen Unterfläche. Die Nägel waren zudem sehr brüchig.

Passager hatte F.H. ein periorales Exanthem und neurodermitische Exkorationen am gesamten Körper.

Im Bereich der Sinnesorgane fielen ein Strabismus divergens, eine doppelte Lidspalte bds., ein leichter Exophthalmus, eine Lidachse in leicht antimongoloider Stellung sowie eine leichte bds. Ptosis auf. F.H. zeigte tiefsitzende, fleischige Ohren, enge Gehörgänge, eine hochgradige Verlegung des Epipharynx bei adenoiden Vegetationen und eine normale Form der Ohrmuschel. Zudem hatte F.H. rechts einen Hodenhochstand.

Weiterhin wurden ein obstruktives Schlafapnoe-Syndrom mit anstoßender, tachypnoeischer Atmung (postnatal) sowie eine geringe bis mittelgradige Schwerhörigkeit bds. (li. > re.) bei kollabierenden Gehörgängen bds. und einer dadurch bedingten Schallleistungsschwerhörigkeit diagnostiziert.

In den kardialen Untersuchungen fand sich ein verdicktes Interventrikularseptum (7-8mm; Z-Score3, 15-4,4), bei normofrequenter, rhythmischer Herzaktion ohne Nachweis eines pathologischen Herzgeräusches.

Bei genauerer Untersuchung fiel eine deutliche Entwicklungsverzögerung auf. Auch in Verlaufsuntersuchungen der Wachstumsparameter war F.H. immer unter der dritten Perzentile der Körperlänge und des Kopfumfanges bei einem erhöhten Körpergewicht zwischen der zehnten und 25. Perzentile (Abb. 3). F.H. wachte nachts häufig auf und hatte Alpträume. Zudem zeigte sich eine verzögerte senso-oralmotorische Entwicklung mit Verlust der Nahrung und Schluckproblemen durch eine hypotone Zunge.



Abb. 2: Übersicht der morphologischen Auffälligkeiten von F.H.

A, dreieckiges Gesicht (30 Monate); B, fleischige und nach hinten rotierte Ohren (16 Monate); C, Nackenfalte (37 Monate); D, spärlicher Haarwuchs (16 Monate); E, Trichterbrust (30 Monate); F, fleischige und platte breite Füße (30 Monate); G, Hyperkeratose (30 Monate).

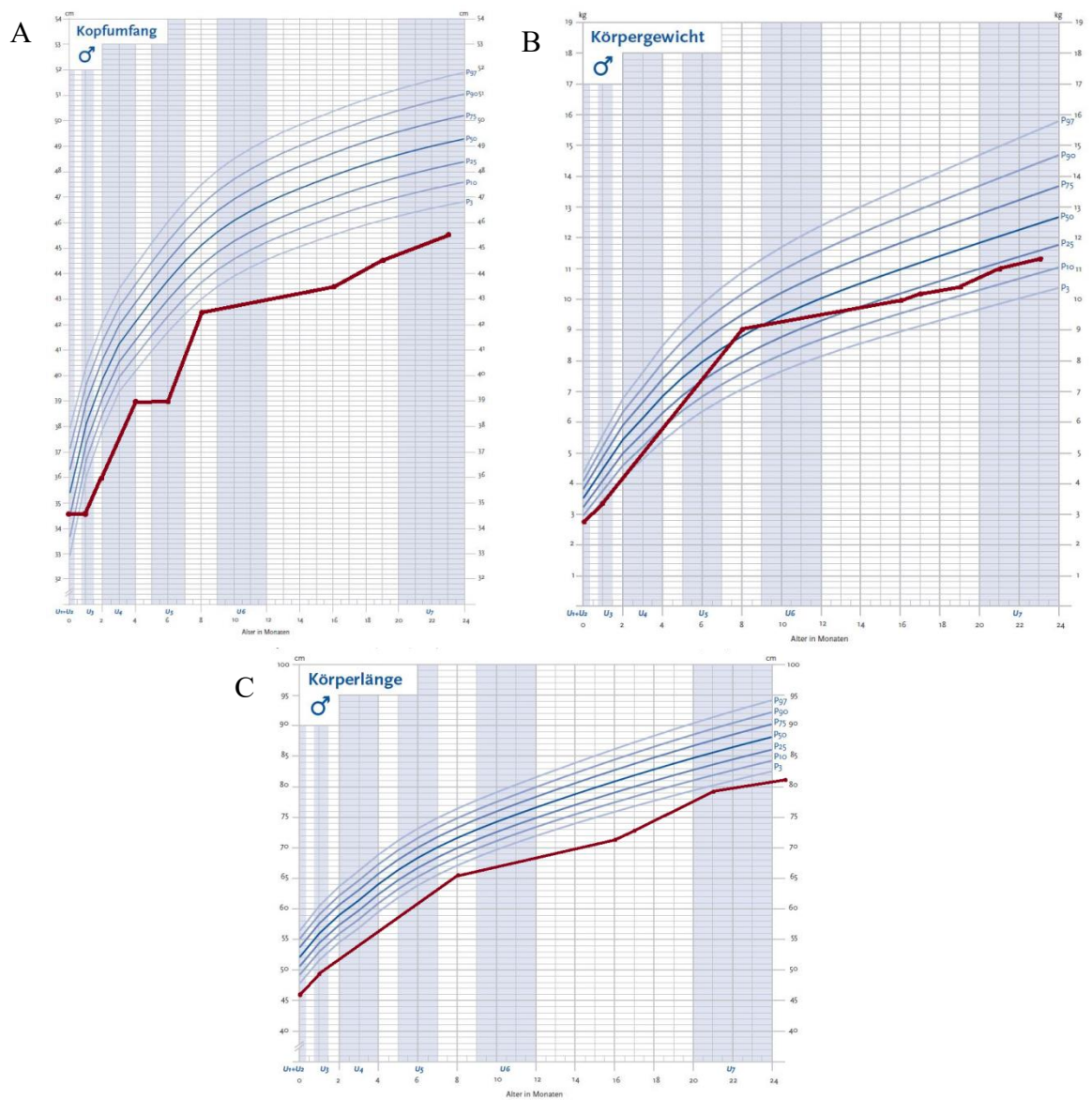


Abb. 3: Die somatische Entwicklung von F.H. innerhalb der ersten 24 Monate. Die Entwicklung von Kopfumfang (A), Körpergewicht (B) und Körperlänge (C) sind als rote Linie in die Diagramme eingezeichnet.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Auffälligkeiten während Schwangerschaft, Geburt und Neugeborenenperiode.

Tab. 1: Auffälligkeiten während Schwangerschaft, Geburt und Neugeborenenperiode (Perzentilen aus (Fenton & Kim, 2013))

Diagnostik während:		
Schwangerschaft	Schwangerschaftsinfekte	einmalig grippaler Infekt (keine Keimbestimmung)
	Feindiagnostik	Verkürzte Röhrenknochen (Femur<Humerus<Ulna), Aplasie der A. umbilicalis sinistra, Polyhydramnion
	Chorionzottenbiopsie	unauffälligen Chromosomensatz (46, XY)
	Ultraschall	Auffällige Nackenfaltendicke in der Frühschwangerschaft
Geburt (19.02.2013)	Geburtsmodus	Spontangeburt
	Dauer	31+1 Wochen
	Apgar	8-8-9
	Nabelarterien-pH	7,36
	Geburtsgewicht	2920g (>99. Perzentile, Z-Score 4,48)
	Körperlänge bei der Geburt	47 cm (99. Perzentile, Z-Score 2,46)
	Kopfumfang bei der Geburt	34,5 cm (>99. Perzentile, Z-Score 4,02)
	Blutgruppe	A Rh positiv
Neugeborenenperiode	Neugeborenen screening	unauffällig
	Hüftsonographie	Typ 1b bds.
	Hörtest (OAE)	links unauffällig, rechts auffällige TEOAE und BERA
	Augenärztliches Konsil	Augenhintergrund unauffällig, kein Anhalt für Glaukom, Veränderungen rechts temporal am ehesten chorioretinale Narbe
	Polysomnographie	beim Trinken Koordinationsprobleme mit tiefen Sauerstoffentsättigungen bis minimal 76/77%. Im Schlaf vermehrte obstruktive und gemischte Apnoen, obstruktiver Apnoeindex 6,6/h.

2. 2 Ergebnisse der klinisch-chemischen und apparativen Diagnostik sowie der Entwicklungsdiagnostik und der genetischen Analyse

Die Ergebnisse der laborchemischen Untersuchung bei Vorstellung im Säuglingsalter waren bis auf eine leichte, latente Hypothyreose (TSH 6,60 mU/ml; Norm 0,4 - 4,2 mU/l) unauffällig und ein Wachstumshormon-Mangel war bei normwertigem IGF-1-Spiegel auszuschließen. Bei bekannter *TRIM21* Mutation und einem in der Literatur beschriebenen Zusammenhang mit einem systemischen Lupus erythematoses wurde als hinweisender Marker der ANA Titer und die IL-6 Konzentration im Serum bestimmt. Die Konzentrationen beider Parameter waren im Normbereich.

Die im Alter von neun und 37 Monaten durchgeführten MRT-Aufnahmen des Kopfes lassen eine allgemeine Minderung des Hirnvolumens mit progredienter Erweiterung der inneren und äußeren Liquorräume erkennen (Abb. 4). Zudem zeigte sich ein cavum veli interpositi ohne klinische Relevanz.

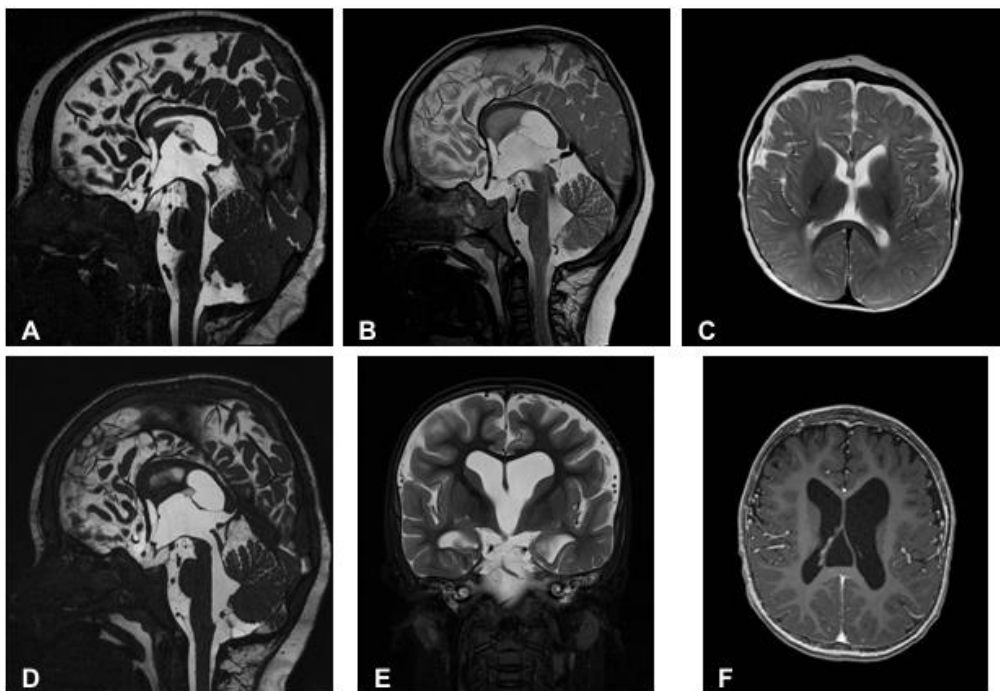


Abb. 4: Relevante Ausschnitte der MRT-Aufnahmen von F.H. im Alter von 21 Monaten (A, E) und 49 Monaten (B, C, D und F)

A, B und D) Sagitale T2-gewichtete Bilder, E) coronare T2, C) transversale T2, F) transversale T1; allgemeine Hirnvolumenminderung mit progredienter Erweiterung der inneren und äußeren Liquorräume, schmaler Balken, cavum veli interpositi

Im EEG konnten zu keinem Zeitpunkt epilepsietypische Potentiale oder Verlangsamungen nachgewiesen werden (Tab. 2)

Tab. 2: Zusammenfassung der Befunde im MRT und EEG

Datum	Untersuchungsmodus	Befund
23.10.2013	EEG	Nuckelartefakte beim Trinken, Mischaktivität, keine epilepsietypischen Potentiale (ETP)
01.11.2013	MRT	Äußere Liquorräume sind frontal bds. leicht betont. Mittelständiges nicht erweitertes Ventrikelsystem (3. Ventrikel 0,6 cm). Septum pellucidum Zyste. In der FLAIR geringe paraventrikuläre Signalanhebung an den Hinterhörnern (re>li). Verklebtes Hinterhorn re. Offener Aquädukt mit Flussphänomen. Hochgestelltes Mesencephalon mit betonter perimesenzephaler Cisterne. Kein Nachweis einer umschriebenen Raumforderung, kein Plagiocephalus, kein Nachweis eines Hydrocephalus occlusus.
23.06.2014	EEG	Für die Altersnorm zu wenig strukturiert, sonst bei eingeschränkter Beurteilbarkeit ohne eindeutige Pathologie, insbesondere ohne eindeutige Zeichen erhöhter cerebraler Anfallsbereitschaft oder einen Herdbefund.
27.01.2015	EEG	Massive Bewegungs- und Nuckelartefakte, erschwerte Beurteilbarkeit, fraglich wechselnder Herdbefund über temporal links DD Artefakt, Mischaktivität, keine eindeutigen ETP's, keine Strukturierung.
27.08.2015	EEG	Sehr reich an Bewegungsartefakten, in den auswertbaren Strecken fraglicher langsamer Herd über occipital intermittierend, keine epilepsietypischen Potentiale.
09.03.2016	MRT	Progrediente Ventrikelweiten ohne Hinweis auf ein Abflusshindernis. III. Ventrikel mit 13 mm im Vergleich zur Voruntersuchung (6mm) progredient erweitert. Aquädukt mit deutlichem Flussartefakt. Kein Anhalt für eine Entwicklungsstörung. Keine frische ICB oder Ischämie. Kein Nachweis einer i.c. Raumforderung.

Zur Einordnung der kognitiven Entwicklung diente ein Teilbereich des Bayley Tests. Ein weiterer Teilbereich beschäftigt sich ebenso wie die Lokomotionsstufen nach Vojta und das Gross Motor Function Classification System (GMFCS), welcher insbesondere die Fähigkeit zur Fortbewegung beurteilt, mit der motorischen Entwicklung. Die Münchener Funktionelle Entwicklungsdiagnostik (MFE) betrachtet viele einzelne Teilbereiche der Entwicklung, unter anderem die Sprache, die Fortbewegung, das Greifalter und die Selbstständigkeit.

- Befunde im Bayley Test im Alter von 25 Monaten:
Dieser zeigte eine deutliche Entwicklungsverzögerung von kognitiv 5 Monaten und motorisch 9 Monaten im Vergleich zu gleichaltrigen normal entwickelten Kindern.
- Lokomotionsstufe (n. Vojta) im biologischen Alter von 38 Monaten:
Stadium 7 von 9
Die Stufe 7 beinhaltet selbstständiges Laufen mit der Fähigkeit, spontan anzuhalten und ist für die Einordnung in die Regelschule heutzutage das entscheidende Kriterium.
Die Stufe 8, die den Einbeinstand beinhaltet und zwischen dem 24. und 48. Lebensmonat erreicht werden sollte, wurde von F.H. nicht erreicht.
- Gross Motor Function Classification System (GMFCS) im biologischen Alter von 38 Monaten:
Stufe 2 von 5 für Kinder zwischen dem 24. und 48. Lebensmonat
Die Stufe 2 des GMFCS beinhaltet, dass die Kinder frei auf dem Boden sitzen, evtl. bestehen Gleichgewichtsprobleme, wenn beide Hände benutzt werden, um mit Gegenständen zu hantieren. Bewegungsübergänge in und aus dem Sitz sind ohne Hilfe eines Erwachsenen möglich. Die Kinder gelangen von stabiler Unterlage in den Stand. Reziprokes Krabbeln auf Händen und Knien ist möglich. Die bevorzugte Fortbewegung ist das Gehen an Möbeln oder das Gehen mit Hilfsmitteln.
Stufe I wird von F.H. nicht erreicht, diese entspräche freiem Gehen ohne Gleichgewichtsprobleme, bei dem beide Hände zum Hantieren mit Gegenständen benutzt werden können und Bewegungsübergänge in und aus dem Sitz vom Boden zum Stand ohne fremde Hilfe möglich sind.
- Münchener Funktionelle Entwicklungsdiagnostik (MFE) im Alter von 41,5 Monaten:
Der Test zeigt in allen betrachteten Teilbereichen, insbesondere der Feinmotorik, weiterhin eine deutliche Entwicklungsverzögerung.
 - Laufalter 17-22 Monate
 - Handgeschicklichkeit 11-14,5 Monate
 - Perzeptionsalter 10-14 Monate

- Sprechalter 13-18 Monate
- Sprachverständnis 9,5-12,5 Monate
- Sozialalter 13-17 Monate
- Selbstständigkeitsalter 11-15 Monate

In der genetischen Analyse zeigten sich neben einem unauffälligen männlichen Chromosomensatz (46, XY)

- eine Duplikation auf Chr. 4 q 26 von etwa 500 kb (Position 116914594-117414663 bp, hg 19)
- eine Deletion auf Chr. 11p15.4 von etwa 130 kb (Pos. 4370854-4499600bp)
- eine Deletion von 9 Nukleotiden auf Chromosom 7, Exon 11 des BRAF-Gens mit der unbekannten Mutation c. 1399_1407 im heterozygotem Zustand
- eine stumme Mutation von KRAS C.483G>A, Aminosäureaustausch p. Arg161Arg, Referenz rs4362222.

3 Bedeutung der genetischen Befunde von F.H.

Auf der Basis des genetischen Befundes wurde eine Literaturrecherche in der Datenbank Pubmed und der angeschlossenen Gendatenbank durchgeführt, um die in Frage kommenden Syndrome herauszuarbeiten.

Stichworte für die Suche waren: Rasopathies (nur human), Cardiofaciocutaneus Syndrome, Noonan Syndrome, Leopard Syndrome, Costello Syndrome, BRAF, TRIM21 mit einer Einschränkung auf Artikel in englischer oder deutscher Sprache.

3.1 Der Ras/MAP-Kinase Signalweg

Der Ras/MAP-Kinase Signalweg ist für die zelluläre Kommunikation zwischen „Umwelt“ (Extrazellularraum) und Zelle und den daraus abgeleiteten Reaktionen essentiell.

Viele Wachstumsfaktoren steuern, nach Bindung an ihre spezifischen und zellmembranständigen Rezeptoren, die Aktivierung bzw. Inaktivierung von Zielgenen. Trotz des spezifischen Triggers ist die so ausgelöste intrazelluläre Signalkaskade konserviert, so dass bei passendem Rezeptor an der Zelloberfläche unterschiedliche Wachstumsfaktoren dennoch ähnliche, partiell auch redundante, zelluläre Effekte haben können.

Die wichtigsten Stimulatoren für den Ras/MAP-Kinase Signalweg sind die Familien der Epidermal Growth Factors (EGFs), der Fibroblast Growth Factors (FGFs) und der Insulin-Like Growth Factors (IGFs).

Den zugehörigen zellmembranständigen Rezeptoren dieser obengenannten Wachstumsfaktoren ist gemeinsam, dass durch die Bindung des Liganden und nachfolgender Homo- bzw. Heterodimerisierung der extrazellulären Rezeptordomäne eine intrazelluläre Konformationsänderung erfolgt. Die dadurch zugänglich gewordene intrazelluläre Rezeptortyrosinkinase Domäne (RTK) kann phosphoryliert werden und durch Bindung von Adapterproteinen (z.B. der Familie der RAS-Proteine, GRB2, CBL, SHP2 und SOS1) die Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade initiieren. Damit ist dieser Signalweg für die Regulation von Zellwachstum und Differenzierung essentiell und sowohl hereditäre als auch erworbene Veränderungen in den Genen dieser Signalkaskade haben schwerwiegende Folgen. Diese reichen von Entwicklungsverzögerungen bis hin zur Onkogenese (Bezniakow, Gos & Obersztyn, 2014).

Nach Aktivierung der extrazellulären Wachstumsfaktoren erfolgt als Folge von Phosphorylierungsvorgängen, die Bindung des aktivierten Ras-Proteins an die regulatorische N-terminale Domäne des RAF-Proteins, die Interaktion mit der cystinreichen Domäne (CRD) in der "conserved region 1" (CR1) und daraufhin die Stimulation der Kinaseaktivität (CR3) und Aktivierung von RAF (Wellbrock, Karasarides & Marais, 2004) (Hanks, Quinn & Hunter, 1988).

So übertragen die Ras-Proteine Phosphatgruppen auf die RAF-Proteine, die ihrerseits die Kaskade der MAP-Kinasen (MEK, MAP2K1, MAP2K2) und schließlich die Effektorkinase ERK1/2 (Bezniakow et al., 2014) (extracellular-signal regulated kinase) (Wellbrock et al., 2004) aktivieren und damit die Translokation in den Zellkern initiieren. Im Zellkern reguliert pERK 1/2 durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren die Expression von Genen, die für Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung relevant sind (Bezniakow et al., 2014).

Zu den Zielgenen von pERK gehören z. B. die Zellzyklusregulatoren Cyclin D1, Cyclin D2 oder Cyclin D3. Eine unkontrollierte Aktivierung von pERK kann im Extremfall zu einer unkontrollierten Zellproliferation führen. Eine solche dauerhafte oder zumindest unkontrollierte Stimulation von pERK kann durch eine supraphysiologische Konzentration von Wachstumsfaktoren oder auch durch Mutationen in den vorgeschalteten Effektorkinasen ausgelöst werden (Domingo & Schwartz, JR, 2011). Abb. 5 gibt einen schematischen Überblick über die zentrale Rolle der RAF-Proteine in der Signalübertragung.

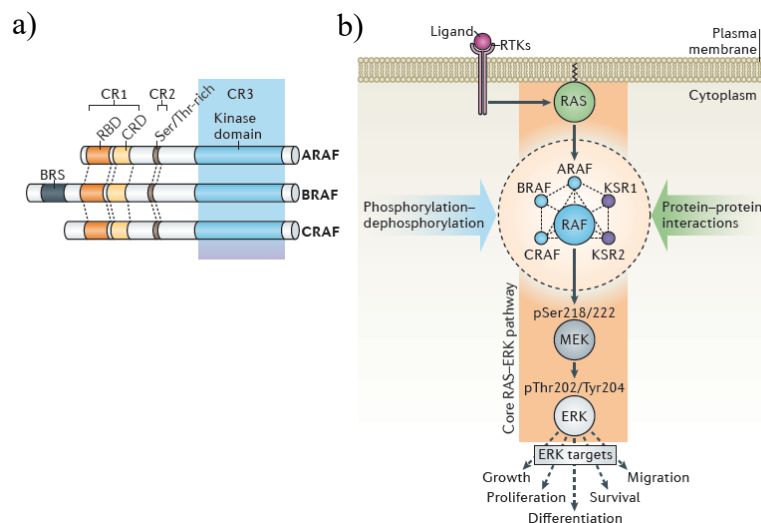


Abb. 5: Schematische Darstellung der Rolle der RAF-Proteine in der Signalübertragung (modifiziert nach (Lavoie & Therrien, 2015))

Die konservierte Struktur der RAF-Proteine (a) sowie die für die Signalübertragung essenziellen Phosphorylierungsreaktionen in der CR3 Region sind dargestellt. Weiterhin sind die durch die Aktivierung von RAF induzierten Reaktionen angedeutet (b).

3.2 Die RAF-Gene

3.2.1 Aufbau, Funktion und Struktur der RAF-Proteine

Die Abkürzung RAF steht für **R**apidly **A**ccelerated **F**ibrosarcoma, was auf die ursprüngliche Identifikation als Onkogen hinweist. Das humane RAF hat drei auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisierte Isoformen, die als *A-RAF*, *B-RAF* und *C-RAF* bezeichnet werden und einen ähnlichen Aufbau mit drei konservierten Domänen (CR1, CR2 und CR3) aufweisen (Tab. 3). In der Tat lassen sich in vielen Tumoren aktivierende Mutationen, die vor allem *B-RAF* betreffen, nachweisen.

Tab. 3: Übersicht über die *RAF*-Gene und -Proteine

Gen	Gen-ID Pubmed	Genlänge (bp)	Proteingröße (kDa)	Zahl der EXone	Chromosom	Lage
<i>A-RAF</i>	369		68		X	11.3
<i>B-RAF</i>	673	205.434	75-100	18	7	q34
<i>C-RAF</i>	5894		72-74		3	p25.2

CR1: enthält die Ras-bindende Domäne (RBD) und die cystinreiche Domäne (CRD) (An et al., 2015), die jeweils Ras-GTP binden können (Domingo & Schwartz, 2011). Im Falle von *B-RAF* kodieren die Exone 3-6 für diese Domäne (Gelb & Tartaglia, 1993). Darüber hinaus sind sowohl die RBD als auch die CRD für den Kontakt zu den Membranphospholipiden entscheidend (An et al., 2015).

CR2: ist eine Serin/Threonin-reiche Domäne, die das Protein 14-3-3 binden kann (An et al., 2015). Die Funktion von B-RAF wird durch Phosphorylierung von Ser365 (in CR2) gehemmt (Domingo & Schwartz, 2011).

CR3: beinhaltet die Kinasedomäne (katalytische Domäne) (Domingo & Schwartz, 2011), die im Falle von *B-RAF* durch die Exone 11-17 kodiert wird (Gelb & Tartaglia, 1993). Kennzeichen der Kinasedomäne ist ein in den meisten humanen Kinasen hochkonservierter glycinreicher Loop (GXGXXG) (Domingo & Schwartz, 2011) (Exon 11) (Roberts et al., 2006), das Aktivierungssegment (G463-V470) mit einem konservierten Motiv aus Asp, Phe und Gly (DFG) und die regulatorische Phosphorylierungsstelle an T598 (Domingo & Schwartz, 2011).

Die Genstruktur sowie die Proteinstruktur des B-RAF ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt. Eine Übersicht über die genaue Lage der verschiedenen Regionen auf dem Protein ist in Tabelle 4 zu sehen.

Das physiologische Genprodukt des *B-RAF* ist das B-RAF Protein, eine Serin/Threonin-Proteinkinase, die der erste Effektor im Ras/MAP-Kinase Signalweg ist (Roberts et al., 2006) und MEK 1 und MEK 2 durch Phosphorylierung aktiviert (Gelb & Tartaglia, 1993) (Roberts et al., 2006).

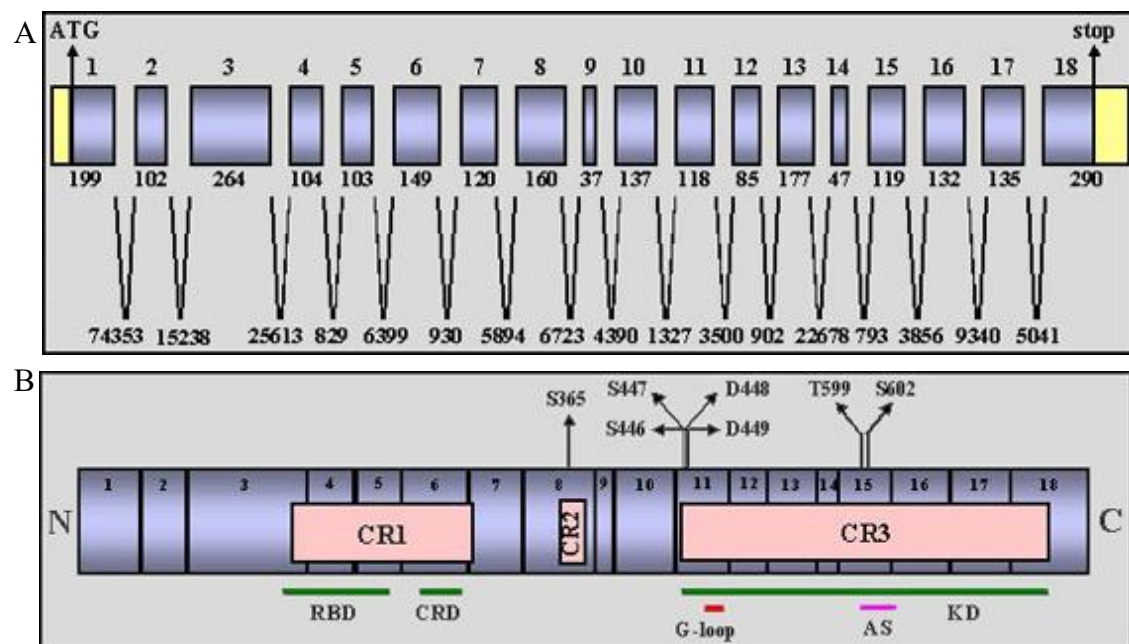


Abb. 6: Schematische Darstellung der Genstruktur (A) und des B-RAF Proteins (B) mit den funktionellen Domänen (Domingo & Schwartz, 2011)

Tab. 4: Struktur und Lage funktionell entscheidender Regionen im B-RAF Protein (aus (Roskoski, 2010))

Wichtige Region	Lage auf dem Protein
RBD	155-227
CRD	234-280
CR1	150-290
CR2	360-375
CR3 (PKD)	415-717
Glycin-reiche Domäne	464-469
14-3-3 Bindungsstelle	Ser365, Ser729
DFG Motiv (Anfang Aktivierungssegment)	594-596
Phosphorylierungsstelle des Aktivierungssegments	Thr599, Ser602
Ende des Aktivierungssegments	(Ala, Pro, Glu) 621-623

B-Raf^{-/-} Mäuseembryonen sterben in utero und zeigen eine Wachstumsverzögerung sowie vaskuläre und neuronale Defekte (Wellbrock et al., 2004), (Wojnowski et al., 1997).

Weiterhin wurde gezeigt, dass die Isoformen der Raf-Proteine sich in ihrer Funktion nicht überschneiden und auch nicht gegenseitig ersetzen können (Wellbrock et al., 2004).

Mit anderen Worten, alle 3 Isoformen sind als Teil eines konservierten Signalwegs zwischen Zelloberfläche und Zellkern für die physiologische Entwicklung essentiell. Im Gegensatz zu *A-RAF* und *C-RAF* ist *B-RAF* ein Onkogen mit mehr als 45 nachweisbar tumorigenen Mutationen (Wellbrock et al., 2004). Ursächlich dafür ist die durch Mutationen deutlich höhere basale Kinaseaktivität der C3 Region.

Mutationen im G-Loop reduzieren in der Regel die Kinaseaktivität und sind so häufig für nicht-onkogene/tumorigene krankheitsrelevante Enzymdefekte ursächlich (Ikenoue et al., 2004).

Im Ruhezustand liegt das *RAF*-Protein in inaktiver Form vor, da die N-terminale Region durch Interaktion mit der katalytischen Domäne (CR3) diese inhibiert.

Aktiviertes RAS katalysiert durch Interaktion mit dem Aktivierungssegment die Dimerisierung der Kinasedomänen (CR3). Heterodimere von B-RAF und C-RAF haben eine deutlich höhere Kinaseaktivität als B-RAF Homodimere. In Tumoren kann es bei entsprechender Mutation in *B-RAF* zur vermehrten Bildung von C-RAF/B-RAF Heterodimeren und dadurch zu einer erhöhten Kinaseaktivität mit konsekutiver Aktivierung des Ras-MAPK Signalwegs kommen (Lavoie & Therrien, 2015).

Proteine wie z.B. das 14-3-3 Protein können die Interaktion zwischen Ras und RAF und damit die Kinaseaktivität modulieren (Wellbrock et al., 2004) (Hanks et al., 1988).

3.2.2 Onkogene Mutationen in B-RAF

In Tumoren unterschiedlichster Lokalisation wurden bislang mehr als 40 verschiedene Mutationen im *B-RAF* Gen identifiziert. Die meisten *B-RAF* Mutationen treten in Schilddrüsen-, Kolonkarzinomen und Melanomen auf (Rahman, Salajegheh, Smith & Lam, 2014). In Melanomzellen treten häufig zusätzliche Mutationen im Tumorsuppressorgen ARF auf. Die Mutation in einem Onkogen (*B-RAF*) und einem Tumorsuppressorgen (ARF) bedingt eine erhöhte Expression von mdm2 mit Hemmung der p53-Funktion (Mercer & Pritchard, 2003).

Aktivierende onkogene Mutationen liegen meistens im G-Loop und im Aktivierungssegment von *B-RAF* (Cantwell-Dorris, O'Leary & Sheils, 2011).

Die häufigste Mutation V600E (ca. 90%) liegt in der Nähe des DFG-Motivs (Rahman et al., 2014) und ist mit einer konstitutiven Aktivierung (Cantwell-Dorris et al., 2011) des MEK/ERK-Signalwegs und einer dadurch bedingten Stimulierung der Zellproliferation assoziiert (Cantwell-Dorris et al., 2011).

Die konsekutive Aktivierung von B-RAF führt über transkriptionsabhängige und -unabhängige Prozesse zur Entstehung von Tumoren, und im Falle hereditärer Mutationen, gegebenenfalls auch zu Entwicklungsveränderungen.

Eine konsekutive Aktivierung von B-RAF wirkt sich unmittelbar auf die Aktivierung, also Phosphorylierung, von ERK aus. Diese pERKs können sowohl antiapoptotisch als auch proliferationsfördernd wirken.

Antiapoptotische Wirkung der cytoplasmatischen pERKs:

- Im Cytoplasma sind pERKs in der Lage, die Apoptose entweder durch Inaktivierung von BAD oder durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB zu verhindern.

Proliferationssteigernde Wirkung der cytoplasmatischen pERKs:

- Translokation in den Zellkern und Stimulation der Onkogen-Expression und/oder Inhibition der Expression von Tumorsuppressorgen.
- Aktivierung der Myosin-leichte-Ketten-Kinasen begünstigt die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen.
- des Weiteren steigern aktivierte pERKs die Expression von Zellzyklusregulatoren (z. B. den Cyclinen), und beeinflussen Apoptose, Zellmigration und Angiogenese. Für letzteres ist die Induktion des vaskulär endothelial growth factors (VEGF) von Bedeutung (Mercer & Pritchard, 2003).

3.3 Rasopathien und syndromale Erkrankungen

Während erworbene Mutationen von *B-RAF* für zahlreiche onkologische Erkrankungen relevant sind, beeinträchtigen hereditäre Mutationen die physiologische Entwicklung (Lavoie & Therrien, 2015).

Da B-RAF insbesondere in neuronalen Zellen exprimiert wird und, wie an B-Raf^{f/-} Mäusen gezeigt wurde, für die Entwicklung des Zentralen Nervensystems (ZNS) essentiell ist, betreffen hereditäre *B-RAF*-Mutationen auch die kognitive Entwicklung. Hinzu kommen unterschiedlich ausgeprägte morphologische Veränderungen und Funktionsveränderungen an anderen Organen.

Anhand der Morphologie mit häufig heterogenen Symptomen und genetischer Diagnose werden das Cardiofaciocutaneous (CFC)-, das Noonan-, das Costello- und das Leopard-Syndrom unterschieden. Allerdings können die morphologischen Unterschiede zwischen den genannten Syndromen marginal sein, so dass trotz genetischer Befunde die Zuordnung diffizil ist.

Beispielsweise lassen sich Patienten mit einem CFC-Syndrom und mit einem Noonan-Syndrom in den ersten Lebensjahren nur schwer anhand der Gesichtsform unterscheiden (Allanson, 2016).

Bei diesen Patienten werden *B-RAF* Mutationen in der Cystin-reichen Domäne gefunden, während Mutationen in Serin 259 zwar in einigen Tumoren, nicht aber bei Patienten mit einer Rasopathie vorkommen. Aber auch die oberhalb von BRAF liegenden Signalmoleküle (z. B. KRAS, HRAS, PTNP11 (SHP-2), SOS1), die wie Ras als GTP-gekoppelte Proteine fungieren, können betroffen sein.

Eine konsekutive Aktivierung von B-RAF wirkt sich unmittelbar auf eine Aktivierung von ERKs aus, die wiederum sowohl antiapoptotisch als auch proliferationssteigernd wirken können (Lavoie & Therrien, 2015).

3.3.1 Die bei F.H. beschriebene Mutation auf Chromosom 7

Bei F.H. ist eine Deletion von 9 Nukleotiden im Exon 11 des BRAF-Gens mit der unbekannten Mutation c. 1399_1407 im heterozygoten Zustand beschrieben und damit eine Rasopathie nachgewiesen worden (Abb. 7).

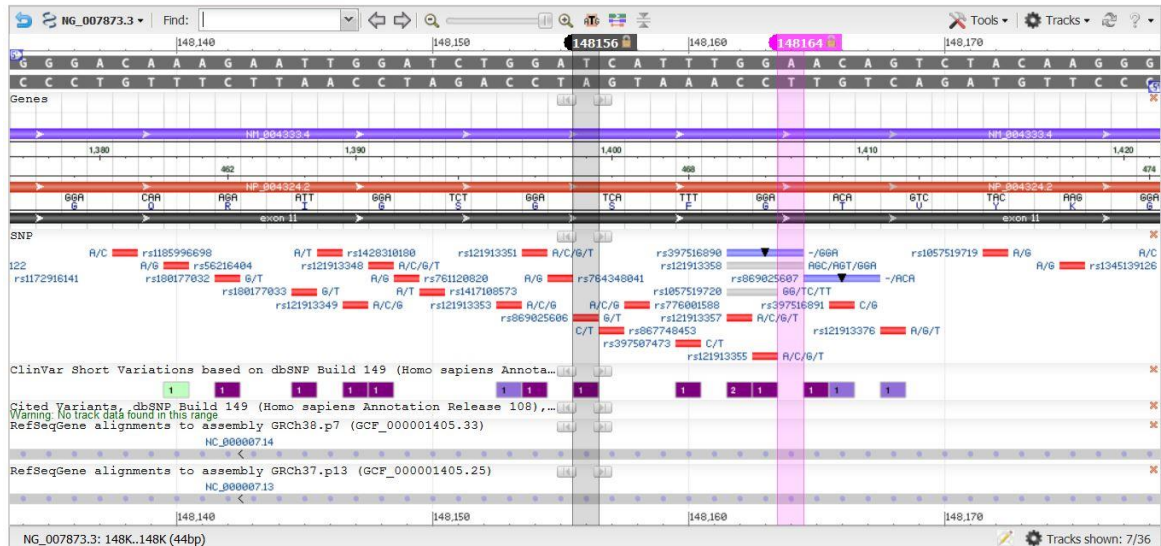


Abb. 7: Lage des bei F.H. betroffenen Bereiches auf Chromosom 7 (Pubmed Gene ID BRAF 673)

Der schwarze und der pinkfarbene vertikale Strich kennzeichnen den bei F.H. deletierten Bereich. Zwischen den beiden Linien stehen die von der Deletion betroffenen Basen (erste Zeile), Aminosäuren (roter Balken) und die in diesem Bereich bekannten RefSeq. Mutationen (unterhalb der Aminosäuren mit rs gekennzeichnet).

3.3.2 Das Cardiofaciocutane-Syndrom

Das Cardiofaciocutane-Syndrom (CFC-Syndrom) ist durch kardiale (Pulmonalstenose, andere Klappenveränderungen, Septumdefekte, hypertrophe Kardiomyopathie, Rhythmusstörungen), cephal und dermale Veränderungen charakterisiert. Zu letzterem zählen Hyperkeratosen, insbesondere palmarplantar, Ichthyose, Ekzeme und Hämangiome (Rauen, 1993a).

Zu den cephalen Veränderungen zählen eine hohe Stirn, ein von beiden Seiten eingeengter Makrocephalus, die Hyperplasie der supraorbitalen Augenbrauenkämme, eine kurze Nase mit flacher Nasenwurzel und nach vorne gedrehten Nasenflügeln, tief angesetzte und nach hinten rotierte Ohren sowie eine Ohrläppchenfalte. Im Bereich des Mundes fallen ein tiefes Philtrum, amorbogenförmige Lippen, ein hoher, gebogener Gaumen und eine relative Mikrognathie auf (Rauen, 1993a).

Das Haar ist meist spärlich, lockig, spröde oder auffällig dick oder dünn. Die Wimpern und Augenbrauen können vermindert sein oder komplett fehlen. Die Nägel sind dystroph und wachsen schnell (Allanson, 2016).

Andere körperliche Symptome sind ein kurzer Nacken, ein Pterygium colli, Brustdeformationen, eine Kyphose und/oder Skoliose und Plattfüße (Rauen, 1993a).

Weitere typische Veränderungen sind gastrointestinale Auffälligkeiten und eine verzögerte motorische und neurokognitive Entwicklung (Pierpont et al., 2014). Zu den neurologischen Auffälligkeiten gehören epileptische Anfälle, ein Makrocephalus, ein Hydrocephalus, eine Hypotonie, eine eingeschränkte Okulomotorik und Veränderungen in der Bildgebung des Gehirns (Pierpont & Wolford, 2016). Eltern betroffener Kinder gaben Schlafstörungen, ein verändertes Schlafmuster, eine Schlafapnoe und extreme nächtliche Unruhe an (Pierpont & Wolford, 2016) (Allanson et al., 2011).

In einigen Fällen zeigt sich auch eine Neoplasie, meist in Form einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) (Rauen, 1993b).

Eine epidemiologische Studie in Japan führt eine Prävalenz vom CFC-Syndrom von 1 auf 810.000 Individuen an (Pierpont & Wolford, 2016).

Das CFC-Syndrom ist in den meisten Fällen durch dominante de-novo Mutationen bedingt. Diese befinden sich zu 75% auf dem *B-RAF* Gen, zu 25% auf dem MAP2K1/MAP2K2-Gen und zu <2% auf dem *KRAS* Gen (Rauen, 1993a). Andere Quellen nennen auch Mutationen auf den Genen MEK1 und -2 als Ursache ((Niihori et al., 2006); (Rodriguez-Viciano et al., 2006)).

3.3.3 Das Noonan-Syndrom

Auch beim Noonan-Syndrom befinden sich die auffälligsten Veränderungen im Bereich des Gesichts. Typisch sind ein Makrocephalus, eine breite Stirn (Rauen, 1993a), eine dreieckige Gesichtsform (Allanson & Roberts, 1993), eine Hyperplasie der supraorbitalen Augenbrauenkämme, schräg herunter hängende Lidspalten mit Ptosis (Roberts et al., 2006), ein Hypertelorismus (Allanson & Roberts, 1993), eine kurze Nase mit flacher Nasenwurzel und nach vorne gedrehten Nasenflügeln, tief angesetzte, nach hinten rotierte Ohren mit prominenter Helix, ein hoher gebogener Gaumen (Roberts et al., 2006) und ein tiefes Philtrum. Weitere Auffälligkeiten sind ein kurzer, breiter Nacken mit vermehrter Nackenhaut und einer tiefen hinteren Haarlinie. Mit steigendem Alter wird der Trapezmuskel prominenter, während die Prominenz der Augen abnimmt (Allanson & Roberts, 1993).

Ein weiteres charakteristisches Merkmal sind Augenveränderungen, die sowohl die Okulomotorik (Schielen, Nystagmus) als auch das Sehvermögen (Fehler der Lichtbrechung, Sehschwäche) betreffen können. Seltener findet man Veränderungen des vorderen Augenabschnitts und des Fundus (Allanson & Roberts, 1993).

Die Qualität und die Menge der Haare sind sehr unterschiedlich. In der frühen Kindheit sind es häufig wenige und feine Haare, während die Haare bei älteren Kindern oft lockig und wollartig sind (Allanson, 2016).

Auch Hautveränderungen kommen beim Noonan-Syndrom vor. Teile der Haut zeigen besonders über gebeugten Arealen, den Oberarmen (Roberts, Allanson, Tartaglia & Gelb, 2013) und im Gesicht eine follikuläre Keratose (Allanson & Roberts, 1993). Außerdem kommen Café-au-lait-Flecken und später Altersflecken vor (Allanson & Roberts, 1993). Weiterhin sind kongenitale Herzdefekte (häufig Pulmonalklappenstenosen, Herzmuskelhypertrophie, Rhythmusstörungen, Septumdefekte, eine Stenose der Pulmonalarterie, Fallotsche Tetralogie, Aortenisthmusstenose) typisch (Rauen, 1993a). Das EKG zeigt in einigen Fällen breite QRS-Komplexe (Roberts et al., 2013).

Die Prävalenz des Noonan-Syndroms liegt bei 1:1000 bis 1:2500 Lebendgeborenen (Romano et al., 2010). Es kann autosomal-dominant vererbt werden. Meistens sind jedoch de-novo Mutationen für das Krankheitsbild verantwortlich (Rauen, 1993a). Das männliche und das weibliche Geschlecht sind gleichhäufig betroffen (Allanson & Roberts, 1993). Es gibt mehrere Gene, in denen Mutationen zum Noonan Syndrom führen. Diese sind: *PTPN11* (40,9%), *SOS1* (11,1%), *RAF1* (4,7%), *KRAS* (1,4%), *SHOC2* (1,7%), *B-RAF* (0,8%) und *NRAS* (0,2%) (Romano et al., 2010).

3.3.4 Das Costello-Syndrom

Häufig wird diese Rasopathie bereits im jungen Kindesalter diagnostiziert (Gripp & Lin, 1993).

Charakteristisch ist ein grobes Gesicht (Roberts et al., 2006) (volle Lippen, großer Mund, volle Nasenspitze) (Gripp & Lin, 1993) und ein durch postnatal verstärktes cerebelläres Wachstum bedingter Makrocephalus (Roberts et al., 2006), der zu einer Chiari I Malformation (Gripp & Lin, 1993), einem Hydrocephalus oder einer Syringomyelie führen kann. Weitere Auffälligkeiten sind eine prominente Stirn, Epikanthalfalten, schräg herunterhängende Lidfalten, eine kurze Nase mit flacher Nasenwurzel und breiter Basis, tief angesetzte und nach hinten rotierte Ohren mit verdickten Helices und Ohrläppchen sowie volle Wangen (Roberts et al., 2006). Meist haben Betroffene eine tiefe, heisere und flüsternde Stimme (Gripp & Lin, 1993).

Die Haare sind häufig lockig (Roberts et al., 2006), spärlich, fein und neigen zum frühzeitigen Ausfall (Gripp & Lin, 1993).

Dermale Veränderungen zeigen sich meist als schlaffe, weiche Haut (Gripp & Lin, 1993), überschüssige Haut über Händen und Füßen und tiefen Falten an Hand- und Fußrücken. Auch kann es zu Hyperpigmentierung (Roberts et al., 2006) und Papillomen im Gesicht und in der Perianalregion kommen. Diese treten jedoch überwiegend erst in der späteren Kindheit auf und bestätigen häufig die Diagnose. Zusätzlich zeigt die Haut eine verfrühte Alterung (Gripp & Lin, 1993).

Im Körperbau zeigt sich eine kurze Statur, ein eingeschränktes Bewegungsausmaß der Ellenbogen, eine Ulnardeviation, eine Lockerheit der kleinen Gelenke und breite distale Phalange (Roberts et al., 2006). Hinzu kommen eine diffuse Hypotonie und damit verbunden eine fehlende Körperspannung. Die Finger sind gespreizt, zeigen eine charakteristische Handhaltung und sind häufig spatelförmig. Durch eine verkürzte/gespannte Achillessehne, die sich häufig erst in der Kindheit entwickelt, kann es zu Stellungsdeformitäten des Fußes, z.B. einem vertikalen Talus, kommen. Auch der übrige Körper kann Deformitäten zeigen. Beispiele dafür sind: Kyphoskoliose, Pectus carinatum, Pectus excavatum, ein asymmetrischer Brustkorb und eine fortschreitende Hüft dysplasie (Gripp & Lin, 1993).

Von den Organen ist auch hier meist das Herz betroffen. Es zeigt Strukturdefekte wie beispielsweise eine Hypertrophie des Herzmuskels (Roberts et al., 2006), eine idiopathische Subaortenstenose oder eine asymmetrische septale Hypertrophie (Gripp & Lin, 1993). Es kommen aber auch Rhythmusstörungen (Roberts et al., 2006), meist in Form von supraventrikulären Tachykardien und seltener als multifokale atriale Tachykardie sowie ektope atriale Tachykardie, vor (Gripp & Lin, 1993).

Das Costello-Syndrom wird autosomal-dominant vererbt (Roberts et al., 2006) und tritt beim männlichen und weiblichen Geschlecht gleichermaßen auf (Gripp & Lin, 1993).

Eine genaue Prävalenz ist aufgrund der Seltenheit des Syndroms nicht bekannt. Die Betroffenen haben eine Mutation im Bereich des *H-RAS* Gens (Roberts et al., 2006).

3.3.5 Das Leopard-Syndrom

LEOPARD ist ein Akronym für die charakteristischen Veränderungen. **L**entigenes, **E**KG Veränderungen, **(O)**cular) Hypertelorismus, **P**ulmonalstenose, **a**bnormale Genitalien, Wachstumsretardierung und sensorineurale Taubheit (**d**eafness) (Gelb & Tartaglia, 1993). Das Erscheinungsbild ist ähnlich wie beim Noonan-Syndrom, aber die Symptome sind etwas milder ausgeprägt. Betroffene haben meist eine dreieckige Gesichtsform, schräg herunterhängende Lidspalten, tief angesetzte, nach hinten rotierte Ohren mit verdickten Helices, einen Hypertelorismus und einen kurzen Nacken mit vermehrter Nackenhaut und einer tiefen hinteren Haarlinie. Sie haben außerdem eine sensorineurale Hörschädigung und zum Teil milde kognitive Einschränkungen.

Auffällig sind viele verteilte, flache, schwarzbraune Altersflecken vor allem im Gesicht, im Nacken und am Oberkörper ohne Befall der Schleimhäute. Auch Café-au-lait Flecken kommen vor und gehen meist den Altersflecken voraus. Außerdem zeigt sich in einigen Fällen eine Hauthyperelastizität. Am Herzen zeigen sich die selben Defekte wie beim Noonan-Syndrom (Gelb & Tartaglia, 1993).

Das Leopard Syndrom wird autosomal-dominant vererbt. Das männliche Geschlecht ist häufiger betroffen als das weibliche, da eine höhere Überlebenschance des männlichen Fetus besteht. Zum Teil liegen diesem Syndrom ebenfalls de-novo Mutationen zu Grunde. Auch zu diesem Syndrom ist in der Literatur keine Prävalenz beschrieben.

Betroffene Gene sind *PTPN11* (90%), *RAF1* (<5%) und *B-RAF* (<5%) (Gelb & Tartaglia, 1993).

3.4 Mutationen auf den Chromosomen 4 und 11

Weiterhin wurden bei F.H. Mutationen auf den Chromosomen 4 und 11 beschrieben. Die physiologische Funktion der betroffenen Gene wird im Folgenden vorgestellt.

3.4.1 Mutationen auf Chromosom 4

Die bei F.H. beschriebene Duplikation auf Chr. 4q26 umfasst etwa 500kb (Position 116914594-117414663), hg 19) (Abb. 8) und betrifft sechs Pseudogene sowie zwei an der Kontrolle der mRNA beteiligte Gene. Weiterhin wurde auf diesem Chromosom eine bereits in der Literatur beschriebene stumme Mutation im *KRAS* detektiert.

Die Duplikation betrifft:

- *CULAP1* (culin 4A pseudogene 1) → Länge 3790 Bp
- *TRMT112P1* (tRNA methyltransferase 11-2 homolog) → Länge 571 Bp
- *MTRNR2L13* (MT-RNR2-like 13 pseudogene) → Länge 1463 Bp
- *TTC39CP1* (tetratricopeptide repeat domain 39 C pseudogene 1) → Länge 719 Bp
- *RLFP1* (rearranged L-myc fusion pseudogene 1) → Länge 1609 Bp
- *EIF3KP3* (eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K pseudogene) → Länge 751 Bp
- *MIR1973* (microRNA 1973) → Länge 44 Bp
- *Hsa-miR-1793*(ncRNA) → Länge 19 Bp



Abb. 8: Lage des betroffenen Bereiches auf Chromosom 4 (Pubmed Gene ID MIR1973 401152)

Die vertikalen blauen und grünen Striche kennzeichnen den bei F.H. duplizierten Bereich. Zwischen den beiden Linien stehen die Namen der dort liegenden, betroffenen Gene.

MicroRNAs (miRNAs) sind kleine nicht-kodierende RNAs, die posttranskriptionell die Genregulation in multizellulären Organismen beeinflussen. Sie beeinflussen sowohl die Stabilität, als auch die Translation der mRNA.

MiRNAs werden von der Polymerase II transkribiert. Das erste Transkript wird durch die Ribonuklease III (Drosha) zur ca. 70-nt-stem-loop precursor miRNA (pre-miRNA) gespalten. Diese wird dann durch die zytoplasmatische Ribonuklease Dicer zur reifen miRNA und zur antisense miRNA (miRNA star) zerlegt. Die reife miRNA ist eingebunden in den RNA-induced silencing complex (RISC), der Ziel-mRNAs durch imperfekte Basenpaarungen mit der miRNA identifiziert. Am häufigsten wird dadurch eine Hemmung der Translation oder eine Spaltung der „fehlerhaften“ mRNA bewirkt (He & Hannon, 2004). Der Ablauf der Produktion und Funktion der microRNA ist in Abb. 9 schematisch dargestellt.

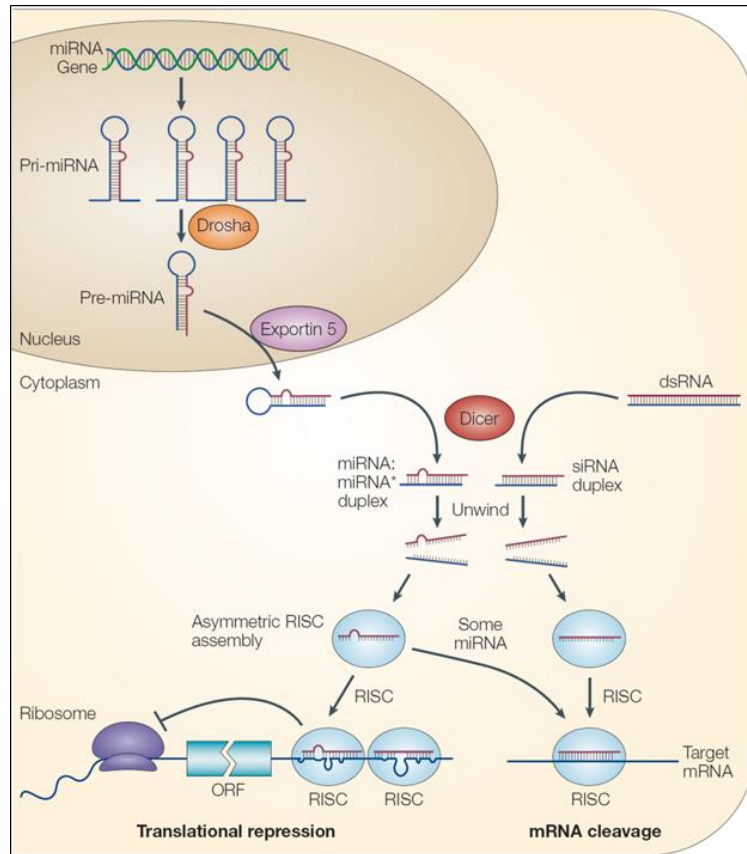


Abb. 9: Schematische Darstellung der Funktion der microRNAs (He & Hannon, 2004)

In diesem Schema sind die aktuellen Vorstellungen zur Entstehung und Funktion der microRNA zusammengefasst. Über Spaltungsvorgänge erfolgt eine Umarbeitung der Pri-miRNA zur miRNA, die Teil des RNA-induced silencing Komplexes ist und für die Kontrolle und die Elimination fehlerhafter mRNA zuständig ist.

3.4.2 Mutationen auf Chromosom 11

Bei F.H. ist eine Deletion auf Chr. 11p15.4 von etwa 130 kb (Pos. 4370854-4499600bp, hg 19) (Abb. 10) beschrieben worden. Diese Deletion umfasst neben vier Pseudogenen aus der Gruppe der Geruchsrezeptoren und zwei Genen, die für Geruchsrezeptoren codieren, auch das *TRIM21* Gen. Im Einzelnen handelt es sich um:

- *OR52B3P* (olfactory receptor, family 52, subfamily B, member 3 pseudogene)
→ Länge 943 Bp
- *OR51R1P* (olfactory receptor, family 51, subfamily R, member 1 pseudogene)
→ Länge 949 Bp

- *OR52P2P* (olfactory receptor, family 52, subfamily P, member 2 pseudogene) → Länge 897 Bp
- *OR52K3P* (olfactory receptor, family 52, subfamily K, member 3 pseudogene) → Länge 947 Bp
- *OR52K1* (olfactory receptor, family 52, subfamily K, member 1) → Länge 1030 Bp
- *OR52K2* (olfactory receptor, family 52, subfamily K, member 2) → Länge 1067 Bp
- *TRIM21* (tripartite receptor containing 21) → Länge 8816 Bp

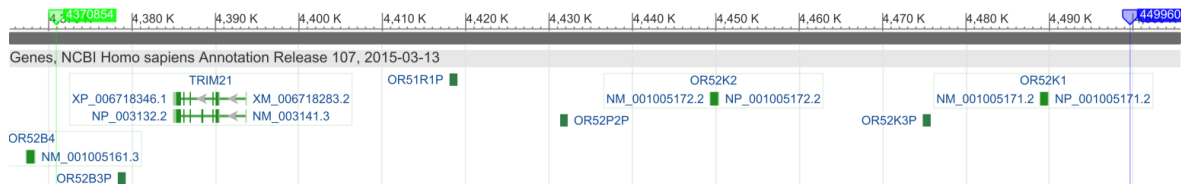


Abb. 10: Lage des bei F.H. betroffenen Bereiches auf Chromosom 11 (aus Pubmed Gene ID TRIM21 6737)

Die vertikalen blauen und grünen Striche kennzeichnen den bei F.H. deletierten Bereich. Zwischen den beiden Linien sind die Positionen der betroffenen Gene angegeben.

3.4.2.1 Die Geruchsrezeptorgene *OR52K2* und *OR52K1*

Beim Menschen gibt es für die Detektion von Geschmack und Geruch 500-750 Rezeptoren, die von ca. 950 Genen kodiert werden. Diese sind auf allen Chromosomen mit Ausnahme von Chromosom 22 und Y lokalisiert. Etwa 350 dieser Gene sind intakt und kodieren für einen potentiell funktionsfähigen Rezeptor.

Die Geruchsrezeptoren sind heptahelicale (7TM-Proteine), G-Protein gekoppelte transmembranöse Rezeptoren (GPCR), an denen die Geruchspartikel, die kleiner als 400 Dalton sind, binden. Geruchsrezeptoren sitzen auf spezifischen Neuronen im olfaktorischen Epithel, welches sich im oberen, hinteren Teil der Nase befindet (Lamina cribrosa, Bulbus olfactorius). Bei Aktivierung der Rezeptoren wird über ein G-Protein eine Adenylatcyclase Typ III aktiviert und cAMP aus ATP freigesetzt.

Das cAMP ermöglicht durch Öffnung des cyclic nucleotide-activated nonselective channel (CNG) den Einstrom von Kationen mit nachfolgender Depolarisation der Membran des

Geruchsneurons und einem dadurch bedingten Anstieg des Aktionspotentials, das letztlich zur Wahrnehmung des Geruchs führt.

Ein bestimmter Geruch aktiviert mehrere Rezeptoren und damit Neuronen, deren Informationen im Kortex zusammenkommen und so als Gesamtgeruch empfunden werden (Gailard, Rouquier & Giorgi, 2004).

3.4.2.2 Regulation von Entzündung und Immunabwehr durch TRIM 21

TRIM21 (tripartite motif-containing protein 21) ist eine E3-Ubiquitinligase für die Interferon regulierende Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF8 und spielt sowohl im angeborenen als auch im erworbenen Immunsystem eine Rolle (Abb. 11) (Yoshimi et al., 2009).

TRIM 21 ist im Zytoplasma der meisten Zellen vorhanden, kommt aber in myeloiden Zellen wie Makrophagen und dendritischen Zellen in besonders hoher Konzentration vor. Es markiert in die Zelle eindringende, mit Antikörpern markierte Viren für den Abbau im Proteasom.

TRIM21 spürt die Antikörper-gebundenen Viruspartikel mit seiner PRYSPRY-Domäne auf, die mit hoher Affinität an die Fc-Region des Antikörpers bindet. Es erkennt Immunglobuline der Klassen M und G und scheint eine Rolle bei der primären und der sekundären Immunantwort zu spielen.

Die E3 Ubiquitin-Ligase Aktivität von TRIM21 katalysiert in der Anwesenheit von spezifischen E2-Enzymen die Bildung von Polyubiquitinketten. Daraufhin erfolgt eine Aktivierung des Immunsystems z.B. über den NF κ B-Signalweg, IRF3, IRF5, IRF7 (Interferon regulierender Faktor) und den Transkriptionsfaktor AP-1.

Als zytoplasmatisches Protein ist es in den Makrophagen und dendritischen Zellen für die weitere Prozessierung der internalisierten, Antikörper-gebundenen Viruspartikel mitverantwortlich, indem es diese durch Übertragung von Polyubiquitinketten für den Abbau im Proteasomen markiert. Dieser Prozess ist über die Aktivierung von NF κ B mit der Freisetzung von Interleukin-6 und anderen ebenfalls proinflammatorischen Cytokinen gekoppelt (Geijtenbeek & Gringhuis, 2013). Weiterhin wurde eine Assoziation zwischen TRIM21 Mutationen und dem Auftreten eines Lupus erythematodes beschrieben.

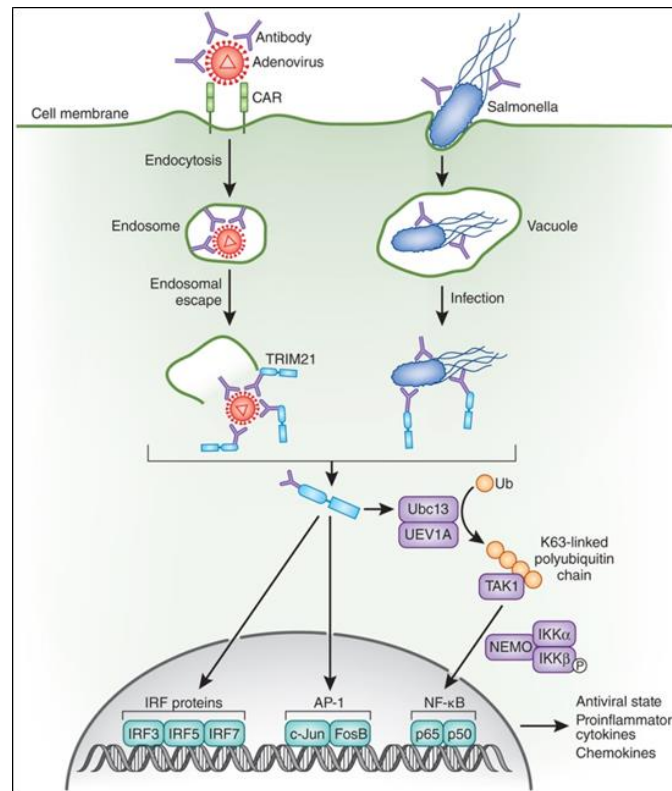


Abb. 11: Die Rolle von TRIM21 bei der intrazellulären Eliminierung von Pathogenen (Geijtenbeek & Gringhuis, 2013)

Bei einer Infektion werden die Pathogene (Viren, Bakterien) durch Antikörper markiert und durch Endozytose ins Cytosol überführt. TRIM21 erkennt die an das Pathogen gebundenen Antikörper und markiert diese mit Polyubiquitinketten. Dadurch wird eine Signalkaskade aktiviert, die unter anderem über die Aktivierung von NFκB und IRF3, 5 und 7 zur vermehrten Freisetzung proinflammatorischer Moleküle führt. Die Aktivierung von TRIM kann daher mikrobielle Infektionen bekämpfen und die erworbene Immunität induzieren.

4 Durchführung und Ergebnisse der ex-vivo Untersuchungen zur Funktion von Interleukin-6 und zur Konzentration des Apoptosemarkers M30

4.1 Verwendete Substanzen und Lösungen

ThermoFisher Scientific (Waltham, Massachusetts):

Zellkulturmedium RPMI 1640 mit 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) und 10% fetalem Kälberserum (FKS)

GE Healthcare (Buckinghamshire, Großbritannien):

Ficoll-Gradient

Greiner Bio One (Kremsmünster, Österreich):

96 Well Mikrotiterplatten

R&D System (Wiesbaden):

Peroxidase-konjugiertes Streptavidin, Maus-anti-hIL-6-Antikörper, Biotin-konjugierter Ziegen-anti-hIL-6 Antikörper, rhIL-6 Protein

Steriles und pyrogen-freies PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,2-7,4)

0.05% Tween® 20 in PBS (Waschpuffer)

1% BSA in PBS (Blockierpuffer)

Substratlösung für den Peroxidase-Nachweis (Tetramethylbenzidin und H₂O₂)

Teco Medical (Bünde)

M30 Elisa zum Nachweis eines Zytokeratin-18 Fragmentes, das im Rahmen der Apoptose aus Hepatozyten freigesetzt wird.

Alle Chemikalien hatten, wenn verfügbar, p. A. Qualität und wurden von der Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (München) bezogen.

4.2 Isolierung und Kurzzeitkultivierung von Peripheral Blood Mononuclear Cells

Von zwei gesunden Probandinnen (Nichtraucher, 25 Jahre) wurden je 10 ml EDTA-Blut in jeweils einem EDTA-Röhrchen abgenommen. Von F.H. wurde ein Aliquot einer EDTA-Blutprobe, die aufgrund einer diagnostischen Indikation entnommen wurde, verwendet. Die PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cell) wurden durch Aufschichtung auf Ficoll mit nachfolgender Zentrifugation zur Ausbildung eines Dichtegradienten isoliert.

In einem Falcon-Röhrchen wurden 5 ml Ficoll mit 2 ml Blut überschichtet und der Ansatz bei 20°C 30 Minuten zentrifugiert (425 g). Damit konnten Plasma (Überstand), mononuk-

leäre Zellen (Leukozyten, Monozyten, Thrombozyten; Interphase) sowie Erythrozyten und Granulozyten (Pellet) separiert werden. Die Schicht der mononukleären Zellen wurde vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette entnommen, in ein weiteres Falcon-Röhrchen überführt, mit PBS auf 10 ml aufgefüllt, resuspendiert und zur Abtrennung des Ficoll und der Thrombozyten erneut für 7 Minuten bei 20°C zentrifugiert (375 g). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml Medium (RPMI mit 1% P/S und 10% FKS) resuspendiert. In einem mit 15 µl Trypanblau versetztem Aliquot der Zellsuspension (ca. 200 µl) wurde die Zahl der vitalen Zellen mit Hilfe einer Neubauerkammer ermittelt. Anschließend wurden die Zellen mit einer Dichte von $1,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml in 12 Well-Kulturplatten ausgesät und bei 37°C kultiviert (5% CO₂, Wasserdampfgesättigt).

4.3 Stimulation der PBMC mit Lipopolysacchariden

Nach einer Ruhephase von 24 Stunden wurden die Zellen bei 37 °C mit verschiedenen Konzentrationen von Lipopolysacchariden (LPS) (0µg/ml, 8,3µg/ml, 25µg/ml) für 0 h, 4 h, 8 h und 12 h stimuliert. Dazu wurde LPS mit einer Konzentration von 1mg/ml in PBS gelöst. Zu den vorgegebenen Zeiten wurden die Überstände für die Bestimmung von IL-6 entnommen, aliquotiert und bis zur Analyse der IL6 Konzentration bei -80°C gelagert. Je Zeitpunkt und Dosis wurden Doppelbestimmungen angesetzt (Groote et al., 1992).

4.4 Bestimmung von Interleukin-6 mit einem ELISA in Zellkulturüberständen

Zur Bestimmung der IL-6 Konzentration wurden die Überstände der verschiedenen Ansätze bei Raumtemperatur aufgetaut.

Als Festphase dienten Flachboden-Mikrotiter-Platten mit hoher Proteinbindungskapazität (Greiner). Als Primärantikörper zur Adsorption des Antigens aus dem Medium wurde ein monoklonaler Maus Anti-Human IL-6 Fängerantikörper und als Sekundärantikörper ein mit Peroxidase gekoppelter Ziegen Anti-Human IL-6 Detektorantikörper eingesetzt. Zum Waschen diente PBS mit 0,05% Tween-20 (w/v), während für die Verdünnung der Antigenlösung PBS mit 1% BSA verwendet wurde.

Zum Nachweis der Immunkomplexe wurde Peroxidase-konjugiertes Streptavidin zugesetzt, welches in PBS mit 20 % FCS verdünnt wurde. Die Menge des gebundenen Streptavidin-Peroxidase-Konjugates wurde durch die Umsetzung mit Tetramethylbenzidin (TMB) bei pH 5,0 (Citrat-Phosphat-Puffer) ermittelt.

Durch Ansäuern mit 50 µl 1N H₂SO₄ wurde die Reaktion gestoppt und die Extinktion im Mikrotiterplattenphotometer bei 492 nm (Referenzwellenlänge 690 nm) gemessen (Engelmann, Wang, Kneitz & Müller-Hilke, 2015).

1. Adsorption des Anti-IL6 Antikörpers an die Festphase:
100 µl des in 0,1M Carbonat-Puffer verdünnten Antikörpers (2µg/ml) pro Well, Inkubation über Nacht bei 37°C
2. Entfernung nicht gebundener Antikörper
Ausklopfen der Platte, 4 x mit PBS/0,05% Tween-20 waschen (200µl/well)
3. Blockieren unspezifischer Bindungsstellen mit 1% BSA/PBS
200 µl/well, 20 Minuten bei RT
4. Waschen
Ausklopfen der Platten, 1x mit PBS/0,05% Tween-20 waschen (200µl/well)
5. Bindung des Antigens (Überstand bzw. Standard, in Blockierlösung verdünnt)
100 µl/well, 2h bei 37 °C
6. Waschen wie unter 2. beschrieben
7. Inkubation mit Biotin gekoppeltem Ziegen Anti-Human IL-6 Antikörper
Verdünnung in Blockierlösung, 100 µl/well, 2h bei RT
8. Waschen wie unter 2. beschrieben
9. Inkubation mit Peroxidase-konjugiertem Streptavidin
Verdünnung in PBS mit 20% FCS, 100 µl/well, 20 min, RT)
10. Waschen wie unter 2. beschrieben
11. Nachweis der gebunden Peroxidase mit Tetramethylbenzidin (TMB) in Gegenwart von H₂O₂; 100 µl/well, 20 min (im Dunkeln), RT
12. Stoppen der Reaktion durch Zusatz von 0,5 N H₂SO₄ (50µl/Well) und Bestimmung der Extinktion im Elisa-Reader

4.5 Bestimmung des Apoptosemarkers M30

In einer Plasmaprobe von F.H. wurde die Konzentration des Apoptosemarkers M30 mit einem nach Herstellerangaben durchgeführten kommerziellen ELISA (Teco Medical, Bünde) im Forschungslabor der Kinder- und Jugendklinik der UMR ermittelt. Dieser ELISA erlaubt die quantitative Bestimmung eines als "M30" bezeichneten Cytokeratin-18 Fragments, das bei einem durch Apoptose ausgelösten Zelluntergang durch Caspasen freigesetzt wird und im Serum zirkuliert. Die Konzentration von M30 ist ein Maß für die Apoptose.

4.6 Ergebnisse der ex-vivo Untersuchungen

4.6.1 Freisetzung von IL-6 aus kultivierten PBMCs nach Stimulation mit LPS

Da *TRIM21* die IL-6 Freisetzung moduliert und IL-6 als proinflammatorisches Zytokin in der Immunabwehr eine wichtige Funktion hat, wurden isolierte PBMC von F.H. mit LPS stimuliert und die Freisetzungskinetik von IL-6 bestimmt (Abb. 12). Analoge Analysen wurden mit PBMCs gesunder Probanden durchgeführt und in allen Fällen ähnliche Ergebnisse erzielt. Damit sind funktionell relevante Konsequenzen der Mutation im *TRIM21* unwahrscheinlich.

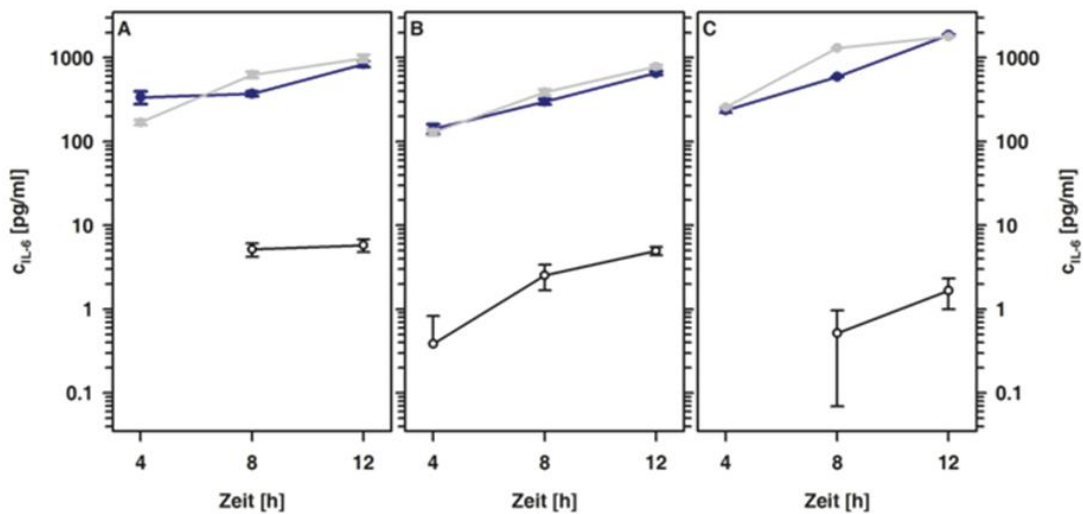


Abb. 12: Zeit- und Dosisabhängigkeit der Freisetzung von IL-6 aus kultivierten PBMC bei gesunden Probanden (A, B) und bei F.H. (C)

PBMC von zwei gesunden Spendern (A, B) und von F.H. wurden isoliert, mit einer Dichte von $1,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml in Kulturmedium ausgesät und die Freisetzung von IL-6 in das Zellkulturmedium nach 4 h, 8 h und 12 h vor Zusatz von LPS (Baseline, schwarz) und nach Zusatz von LPS (8.3 μ g/ml, blau; 25 μ g/ml, grau) bestimmt.

4.6.2 Quantitative Bestimmung des Apoptosemarkers M-30 im Plasma

Um zu überprüfen, ob die bei F.H. beschriebene Mutation im *B-RAF* mit einer Steigerung der Apoptoserate einhergeht, wurde in einer Plasmaprobe die Konzentration eines Cytokeratin 18 Fragments (M30) bestimmt. Auch hier zeigten sich keine von der Norm abweichenden Befunde.

5 Diskussion

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht der Patient F.H., der mit offensichtlichen, morphologischen Auffälligkeiten bei subtiler klinischer Symptomatik in der Kinder- und Jugendklinik der UMR vorgestellt wurde. In der genetischen Analyse zeigten sich multiple Veränderungen, die auf eine Rasopathie hinweisen. Ziel dieser Arbeit war es, die komplexen Befunde und Symptome anhand bekannter Daten aus der Literatur einzuordnen und zu bewerten.

Die phänotypischen Veränderungen von F.H. sowie die bei ihm vorliegende Mutation im *B-RAF* passen zu drei in der Literatur beschriebenen Syndromen, die ebenfalls durch Mutationen im *B-RAF* gekennzeichnet sind. Diese Mutationen betreffen unterschiedliche Exone und werden mit extrem unterschiedlicher Häufigkeit bei den Patienten beobachtet. In Abb. 13 und in Tabelle 5 sind die in der Literatur beschriebenen *B-RAF* Mutationen der Exone 6 bis 16 sowie die Assoziation mit den syndromalen Rasopathien zusammengestellt.

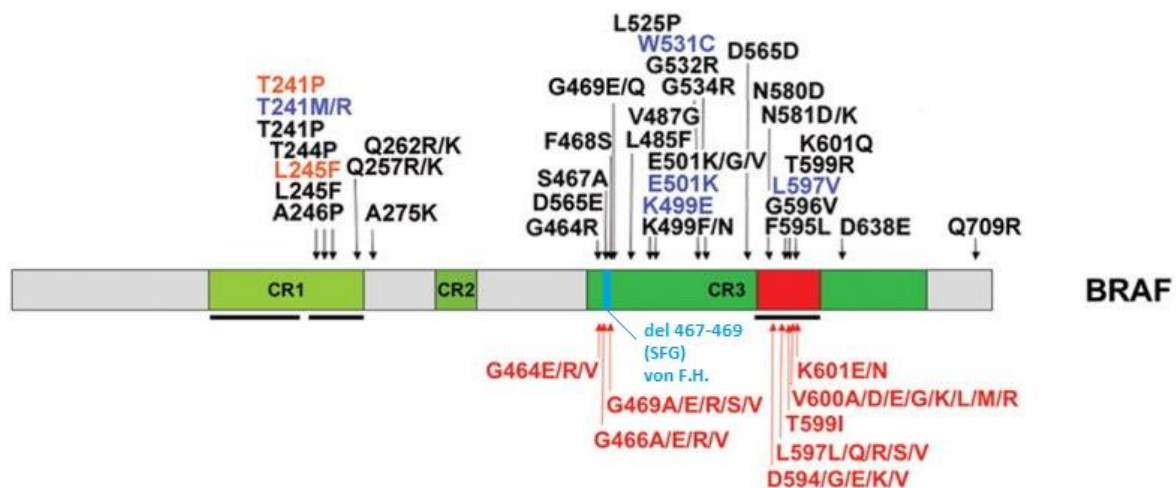


Abb. 13: Lage der Mutation von F.H. in Beziehung zu anderen häufigen, mit menschlichen Erkrankungen verbundenen Mutationen in B-RAF (Tartaglia & Gelb, 2010)

Die Domänen von BRAF sind eingezeichnet (CR: conserved region; RBD: Ras binding domain; CRD: cysteine-rich domain). Über der schematischen Abbildung sind die mit LS, NS, CFCS assoziierten Keimbahnmutationen, und unterhalb die mit Tumoren assoziierten somatischen Mutationen gekennzeichnet. Bei den mit Tumoren assoziierten Mutationen sind nur solche angegeben, die mit einer Prävalenz von $\geq 1.5\%$, in COSMIC Datenbank (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>) angegeben sind. Die missense-Mutationen, die phänotypisch zum NS und LS passen, sind farblich gekennzeichnet (NS blau und LS orange).

Tab. 5: Position der bei F.H. (farblich hervorgehoben) und in der Literatur beschriebenen B-RAF-Mutationen bei Patienten mit Noonan-, Cardiofacio-cutaneous- und Leopard-Syndrom (Niihori et al., 2006), (<http://www.omim.org/entry/164757#0012>), (Sarkozy et al., 2009), (Schulz et al., 2008)

Individuen (Anzahl)	Exon	Nukleotidaustausch	Aminosäureaustausch
NS (270)	6	722 C=T	Thr241Met
NS (1)	6	722 C=G	Thr241Arg
LS (6)	6	721 A=C	Thr241Pro
LS	6	735 A=G	Leu245Phe
CFC (2)	6	730 A=C	Thr244Pro
CFC (33)	6	735 A=T	Leu245Phe
CFC (1)	6	736 G=C	Ala246Pro
CFC (1)	6	770 A=G	Gln257Arg
CFC	6	784 C=A	Gln262Lys
CFC (1)	6	823 G=A	Glu275Lys
CFC	11	1391 G=Q	Gly464Gln
CFC (3)	11	1403 T=C	Phe468Ser
CFC (1)	11	1406 G=A	Gly469Glu
F.H.	11	del 1399_1407 SFG	del 467-469 Ser, Phe, Gly
NS	11	1409C=G	Val470Ile
CFC (1)	12	1455 G=C	Leu485Phe
CFC (1)	12	1495 A=G	Lys499Glu
CFC (1)	12	1497 A=C	Lys499Asn
CFC (1)	12	1501 G=A	Glu501Lys
CFC (2)	12	1502 A=G	Glu501Gly
CFC (1)	13	1574 T=C	Leu525Pro
NS (2)	13	1593 G=C	Trp531Cys
CFC	13	1600 G=C	Gly534Arg
CFC (1)	14	1738 A=G	Asn580Asp
CFC (2)	14	1741 A=G	Asn581Asp
CFC (1)	15	1785 T=A	Phe595Leu
CFC (2)	15	1785 T=G	Phe595Leu
NS (1)	15	1789 C=G	Leu597Val
CFC (1)	15	1796 C=G	Thr599Arg
CFC (2)	15	1801 A=C	Lys601Gln
CFC (1)	16	1914 T=G	Asp638Glu
CFC (1)	16	1914 T=A	Asp638Glu

Die Tabellen, auf denen diese Übersicht beruht, sind im Anhang wiedergegeben.

Die meisten Übereinstimmungen der phänotypischen Merkmale von F.H. gab es mit den Symptomen des CFC-Syndroms, das am häufigsten mit Mutationen des *B-RAF* vergesellschaftet ist. Auch mit dem Noonan-Syndrom gibt es, insbesondere für die Veränderungen im Kopf- und Gesichtsbereich, eine Reihe von Übereinstimmungen zwischen F.H. und den Angaben in der Literatur. Die markantesten und in der Literatur beschriebenen phänotypischen Auffälligkeiten sind in Abb.14 zusammengestellt. Mit dem Leopard-Syndrom gibt es am wenigsten Übereinstimmungen und für das Costello-Syndrom sind bisher keine Fälle mit einer *B-RAF*-Veränderung beschrieben. Bei F.H. ist auf der Basis der Zusammenschau aller Befunde ein CFC-Syndrom am wahrscheinlichsten.

Neben den bereits beschriebenen Veränderungen fällt besonders das leicht greisenhafte Aussehen in jungen Jahren auf. Einige der morphologischen Stigmata sind mit zunehmendem Alter weniger ausgeprägt.

In der Literatur werden *B-RAF*-Mutationen ganz überwiegend in Relation zur Entstehung und Progression onkologischer Erkrankungen behandelt und dieser Aspekt steht auch bei der Beurteilung hereditärer *B-RAF* Veränderungen unausgesprochen im Vordergrund, da sie häufig die Kinaseaktivität der Conserved Region 3 und innerhalb dieser Region den Glycin-reichen G-loop betreffen (Ikenoue et al., 2004; Rajagopalan et al., 2002; Yuen et al., 2002).

So umfasst die bei F.H. beschriebene Deletion der Aminosäuren 467 bis 469 den bei dem Non-Hodgkin-Lymphom beobachteten Austausch von AS 469 (Gly-->Arg oder Gly-->Ala). Auch bei Patienten mit einem Kolonkarzinom wurden in diesem Bereich Veränderungen der Aminosäuresequenz beobachtet (Arg462Ile, Ile463Ser, Gly464Glu) (<http://www.omim.org/entry/164757#0012>). Diese Befunde weisen darauf hin, dass die bei F.H. beschriebene Deletion möglicherweise auch das Risiko für eine Tumorerkrankung erhöht. Vor diesem Hintergrund ist eine enge Anbindung an die Klinik mit regelmäßigen Vorsorgeuntersuchungen sicher zu empfehlen. Allerdings sollte auch bedacht werden, dass viele der Mutationen, die in diesem speziellen Segment des B-RAF beschrieben wurden, die Kinaseaktivität eher hemmen und mit anderen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden. Vor diesem Hintergrund ist auch ein kausaler Zusammenhang mit den kognitiven Einschränkungen und der generellen Entwicklungsverzögerung denkbar (Ikenoue et al., 2004). Die zellbiologischen und letztlich auch tierexperimentellen Studien, die notwendig sind, um die Auswirkungen der bei F.H. vorliegenden Deletion zu charakterisieren, übersteigen die in unserer Arbeitsgruppe vorhandenen Möglichkeiten bei weitem.

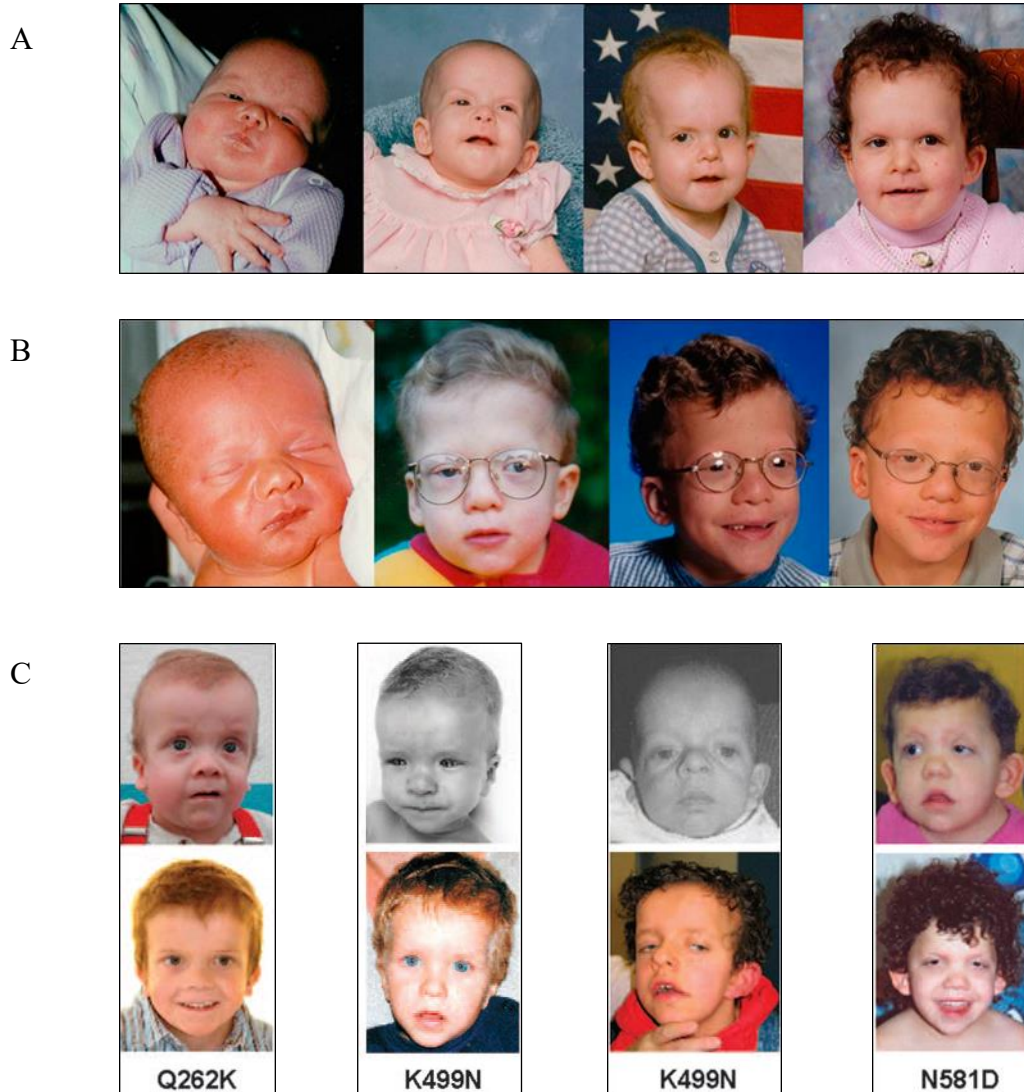


Abb. 14: Phänotypische Veränderungen im Kopf- und Gesichtsbereich von Patienten mit einem CFC-Syndrom (modifiziert nach (Pierpont et al., 2014; Schulz et al., 2008))

Die Abbildungen zeigen verschiedene vom CFC-Syndrom betroffene Patienten mit jeweils unterschiedlichen Mutationen und deren cranialen Auffälligkeiten. In den Abbildungen A und B ist jeweils die zeitliche Entwicklung eines Patienten mit einer Mutation im BRAF-Gen zu vier verschiedenen Zeitpunkten gezeigt. Der Patient in Abbildung A, welcher eine BRAF p.Q257R missense Mutation hat, ist von links nach rechts im Alter von 4 Tagen, 3 Monate, 3 Jahre, 5 Jahre gezeigt, und der Patient in Abbildung B, der eine BRAF MEK2 p.F57C missense Mutation hat, ist von links nach rechts im Alter von 1 Tag, 3 Jahre, 7 Jahre, 9 Jahre zu sehen. Abbildung C zeigt weitere 4 Patienten zu jeweils zwei Zeitpunkten.

Anders stellte es sich für die ebenfalls beschriebene Mutation im *TRIM21* dar. Aus Untersuchungen an *trim21*^{-/-} Mäusen ist bekannt, dass diese Tiere im Vergleich zu wildtyp Mäusen einen höheren IL-6 Spiegel aufweisen und auf lokale Traumata, z.B. das Stechen einer Ohrmarke, mit erhöhten Entzündungswerten und Induktion einer Autoimmunreaktion reagieren (Espinosa et al., 2009; Yoshimi et al., 2009). Daher sollte überprüft werden, ob sich die beschriebene Mutation des TRIM21 auf die Freisetzung von IL-6 auswirkt. Es zeigte sich, dass bei F.H. der IL-6 Spiegel im „Ruhezustand“, also bei obligatem Fehlen von Infekten und traumatischen Ereignissen, im Normbereich lag. Auch isolierte PBMCs reagierten auf die Stimulation mit LPS mit einer physiologischen IL-6 Freisetzung. Daher kann man davon ausgehen, dass bei F.H. IL-6 als unspezifischer Marker einer Entzündungsreaktion genutzt werden kann.

5.1 Ethische und Philosophische Überlegungen zum Umgang mit diagnostischen Befunden

Während der Beschäftigung mit diesem komplexen genetischen Befund rückten auch die ethischen Aspekte immer stärker in den Mittelpunkt. So spielt neben dem Bemühen, möglichst alle genetischen Veränderungen in einen kausalen Zusammenhang mit der Erkrankung zu bringen, auch das Recht auf Nichtwissen, zum Beispiel bezogen auf das Risiko einer Krebserkrankung, die geschätzte Lebenserwartung oder die Entwicklung von Intelligenz und Selbstständigkeit eine zentrale Rolle. Weiterhin ist abzuwägen, ob Eltern das Recht haben, diese Informationen über und für ihre Kinder zu verlangen (treuhänderische Rechtsstellung der Eltern, BGB §§ 1627, 1666).

Das Ziel ist es eine möglichst große Lebensqualität zu erschaffen, die sich nicht nur aus der körperlichen Gesundheit, sondern auch aus dem Wissen oder eben auch Nichtwissen über die Krankheit und den Umgang mit dieser zusammensetzt. Hierbei stehen klar das Wohl und der Wille des Betroffenen im Vordergrund. Die freie Entscheidung über den Verzicht auf krankheitsrelevante Informationen mit einer Ungewissheit über eine möglicherweise bestehende kurative Therapie könnte beispielsweise dann eingeschränkt werden, wenn es um die Fortsetzung einer beruflichen Anstellung oder gezahlte Gelder bei Krankheitstagen geht. Es kann zu Situationen kommen, in denen das Interesse des Betroffenen gegen das Interesse des Arbeitgebers steht, der ggf. genaue Information wünscht, um den Krankheitsverlauf, die weitere Arbeitsfähigkeit und weitere auf ihn zu kommende Arbeitsausfälle einschätzen zu können. Auch die Krankenkassen und Versicherungen könnten ein gegenteiliges Interesse mit dem Wunsch eines maximalen Erkenntnisgewinns über die vorliegende Erkrankung haben, bevor sie eventuelle Zahlungen, Rehabilitationen oder beispielsweise Hilfsmittel genehmigen.

Es ist also eine Vielzahl von Faktoren bei der Entscheidung des Einzelnen über „Wissen“ oder „Nichtwissen“ zu berücksichtigen.

Die prädiktive Medizin ist in der Lage, Wissen und Informationen bereit zu stellen, die das Handeln des Betroffenen leiten und den Rahmen für präventive Maßnahmen definieren können. Das Ausmaß dieser Information und die möglichen therapeutischen Konsequenzen bestimmt, nach bester ärztlicher Informationsvermittlung, dann der Patient selber. Auch die vierte Schiene der Medizin, die Palliativmedizin, wird durch Prädiktion unterstützt, indem der Fokus auf die noch verbleibende Lebenszeit gerichtet wird und somit zwar „Dem Leben nicht mehr Jahre, aber den Jahren mehr Lebensqualität geschenkt werden kann.“ (Nach Cicely Saunders, Begründerin der modernen Hospizbewegung und Palliativmedizin). Die Molekularbiologie eröffnet neue Möglichkeiten der Risikodiagnostik und der Früherkennung. Wie Hans-Martin Sass bereits sagte „Macht die Kenntnis der Information, der genetischen Information, das Leben nicht leichter, nicht problemloser, aber es macht das Leben menschlicher, weil es zur verantwortlichen Gestaltung des Lebens aufruft.“ (Gunnar Duttge, „Das Recht auf Nichtwissen in der Medizin“; DuD-Datenschutz und Datensicherheit 2010). Er bewertet den Erkenntniszuwachs positiv und als Voraussetzung suffizienter Prävention.

Auf der anderen Seite wird dieser Ansatz auch kritisiert. Dies gilt insbesondere dann, wenn eine diagnostizierbare Veränderung entweder durch präventive Maßnahmen nicht zu verhindern oder nicht kausal zu therapieren ist. In diesen Fällen ergeben sich aus dem „Wissen“ keine zusätzlichen Handlungsspielräume, aber möglicherweise kommt es zu erheblichen Einbußen der Lebensqualität für den "Wissenden". Daher ist als besondere Herausforderung der prädiktiven Medizin das Recht auf Nichtwissen als ethische Grundlage zu diskutieren. Diese Auffassung unterstützt auch Richard Power, der als einer der neun ersten Menschen seinen genetischen Code entschlüsseln ließ. Zum Thema Nichtwissen sagte er: „Denn die klassisch-aufklärerische Annahme, jede Information sei ein Gewinn für die Selbstbestimmung, kann im Blick auf die prädiktive Medizin nicht grundsätzlich bestätigt werden. Ganz im Gegenteil kann eine gewisse Form der Ungewissheit und Schicksalhaftigkeit – also die bewusste Annahme von Kontingenzen – die Handlungsfähigkeit eher steigern. Zur wahren Autonomie gehört es dann, bestimmte Informationen nicht zu haben und nicht zu wollen, aber selbst bestimmen zu können, welche dies sind und v. a.: wann und in welchem Umfang man sie haben möchte“ (Winkler, Lazerath Handbuch der Bioethik).

Auch in den Gesetzestexten wurde beispielsweise im Übereinkommen über Menschenrechte und Biomedizin vom Europarat dem Recht auf Wissen das Recht auf Nichtwissen zur Seite gestellt (Council of Europe. Übereinkommen zum Schutz der Menschenrechte und der Menschenwürde im Hinblick auf die Anwendung von Biologie und Medizin)

(Gendiagnostikgesetz (§9 Abs. 5)). Dieser Rahmen soll dazu beitragen, die persönliche Lebensqualität der Betroffenen zu schützen. Diese kann durch das Wissen um fehlende Therapieoptionen und bedrohendes Wahrscheinlichkeitswissen beeinträchtigt werden. Daher ist vor allen diagnostischen und insbesondere auch genetischen Untersuchungen eine gute Aufklärung für die Entscheidung zwischen "Wissen" und "Nichtwissen" essentiell. Nur so ist eine ethisch legitimierte und wohlüberlegte Entscheidung zwischen diesen Optionen gewährleistet (Arntz, 2016).

Ein weiteres Thema ist insbesondere bei genetischer Diagnostik die unvermeidliche Miterfassung von Daten, die nicht nur den Probanden selber, sondern auch seine Angehörigen betreffen. Die Aufklärung über mögliche Konsequenzen einer genetischen Untersuchung bezieht sich lediglich auf den Probanden selber und nicht auf die möglicherweise ebenfalls betroffenen Blutsverwandten. Diese müssten aber ebenso vor der Untersuchung gefragt werden, ob sie bei möglicherweise pathologischem Ergebnis eine Information wünschen. Das Gendiagnostik Gesetz empfiehlt im Fall eines positiven Befundes eine genetische Beratung der Verwandten (§10 III S.4 GenDG), bietet aber die Option eines „Nichtwissens“ nicht an. Besonders in der Pränataldiagnostik ist das Recht auf Nichtwissen ein wesentliches Thema. Schwangere Frauen werden bereits im Vorfeld der Untersuchung über das „psychologische und ethische Konfliktpotential“ (Ziff. 2.2. der PND-Richtlinien der Bundesärztekammer) einer solchen Untersuchung aufgeklärt und haben auch das Recht, sich der Untersuchung oder dem Ergebnis zu verweigern.

Strittig ist, ob das Neugeborenen Screening auf die behandelbaren Erkrankungen begrenzt bleiben sollte, da auch das Neugeborene ein Recht auf Selbstbestimmung und Nichtwissen hat. Laut BGB §§ 1627 und 1666 sind die Eltern stets dem Wohl ihrer Kinder verpflichtet. Die Freiwilligkeit zur Untersuchung nach ausführlichem Aufklärungsgespräch ist allerdings aktuell in dem zugrundeliegenden Gesetzesabschnitt nicht explizit vorgesehen (vgl. § 3 Nr. 9 GenDG).

Auch bei den bildgebenden Verfahren spielt das Recht auf Nichtwissen eine große Rolle. Hier muss geklärt werden, ob der Untersuchte bei Zufallsbefunden wie zum Beispiel einem Tumor oder einer anderen bösartigen Veränderung informiert werden möchte (Duttge 2010, Das Recht auf Nichtwissen in der Medizin).

5.2 Schlussfolgerung und Ausblick

Auch mit einer genetischen Aufarbeitung ist bei Kindern mit einem syndromalen Phänotyp eine Zuordnung zu einem bestimmten Syndrom nicht immer eindeutig möglich. Häufig ergeben sich verschiedene genetische Veränderungen, deren Zusammenspiel zu den phänotypischen Auffälligkeiten führt. Trotz der Bedenken und Erwartungen, die sich aus dem Wissen über genetische Veränderungen ergeben, ist die Aufarbeitung der Genetik

mindestens für den behandelnden Arzt wichtig. Der Vergleich zwischen Patienten mit ähnlich lokalisierten Mutationen ist eine Möglichkeit, die Lebenserwartung, die weitere Entwicklung und/oder das Krebsrisiko abzuschätzen. Die genaueren Kenntnisse über die Auswirkungen der genetischen Veränderungen sind Basis einer wenn nicht therapeutischen so doch zielgerichteten Behandlung und Förderung und können ggf. auch mit Hilfe eines multidisziplinären Teams ermöglicht werden. Für die Eltern ist das Wissen um die Ursache für die "Anomalie" ihres Kindes häufig sehr wichtig und entlastend, da es Schuldgefühle nehmen und den Blick auf die Möglichkeiten des Kindes freigeben kann. Auch für das Kind ist es eine Entlastung, da so genauer auf seine Bedürfnisse eingegangen werden kann, und es nicht mit unerfüllbaren Erwartungen konfrontiert wird. Es kann genauso „angenommen werden, wie es ist“.

6 Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit einem komplexen Fall aus der Kinder- und Jugendklinik der Universitätsmedizin Rostock. Bei dem Patienten fielen neben einer allgemein verzögerten Entwicklung morphologische Stigmata auf, die zum Verdacht einer syndromalen Erkrankung und schließlich zur genetischen Diagnostik führten. In der genetischen Untersuchung zeigten sich neben multiplen Veränderungen mit unklarer funktioneller Relevanz auch Veränderungen im BRAF. In der Literatur werden Noonan-, Cardiofaciocutaneous- und Leopard-Syndrom als Rasopathien zusammengefasst, wobei die Differenzierung zwischen den Syndromen keineswegs immer eindeutig möglich ist.

Ziel dieser Arbeit war es daher, eine Übersicht der genetischen und phänotypischen Merkmale des Patienten F.H. zu erarbeiten und mit den in der Literatur beschriebenen Fällen zu vergleichen. Anhand der Ergebnisse wird versucht, aus dem komplexen Phänotyp ein schlüssiges Bild zu schaffen und anhand des Wissens über die Funktion der betroffenen Gene eine grobe Einschätzung über den zukünftigen Verlauf der Entwicklung des Patienten und mögliche Komplikationen zu geben.

Die mit der bei F.H. vorliegenden BRAF-Mutation möglicherweise verbundene Aktivierung der Apoptose konnte weitestgehend ausgeschlossen. Dazu wurde im Serum von F. H. die Konzentration eines durch Caspase freigesetzten Cytokeratin-18 Fragmentes mit einem kommerziellen Assay (M30-ELISA) quantitativ bestimmt.

Um die funktionelle Relevanz der bei F.H. unter anderem beschriebenen Mutation im TRIM21 zu überprüfen, wurden in-vivo Untersuchungen an PBMCs durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit LPS stimuliert und die Zeit- und Dosisabhängige Freisetzung von IL-6 in den Zellkulturüberstand mit einem ELISA ermittelt. Auch hier zeigten sich keine auffälligen Befunde.

7 Thesen der Dissertation

1. Syndromale Erkrankungen sind häufig mit einem charakteristischen Phänotyp vergesellschaftet.
2. Die genetische Diagnostik kann bei der Einordnung syndromaler Erkrankungen helfen.
3. Die Zuordnung zu einer seltenen syndromalen Erkrankung setzt neben apparativer Diagnostik und genetischen Untersuchungen eine genaue Anamnese und Beobachtung des Kindes voraus.
4. Rasopathien gehören zur Gruppe der seltenen Erkrankungen.
5. Mutationen im *B-RAF* Gen können sowohl tumorigene als auch somatische Mutationen zur Folge haben.
6. Phosphorylierungsvorgänge dienen zur Aktivierung und Inaktivierung von Signalwegkomponenten.
7. Das Noonan-, das Leopard- und das CFC-Syndrom sind Rasopathien mit subtilen Unterschieden in Phänotyp und klinischer Symptomatik.
8. Die Entwicklung von F.H. wird durch engmaschige Begleitung und eine Hilfsmittel gestützte Therapie gefördert.
9. Die Aufarbeitung eines komplexen genetischen Befundes hilft den Eltern, ihr Kind besser zu verstehen.
10. Das „Nichtwissen“ gilt es einem Patienten immer zur Wahl zu stellen.

8 Literaturverzeichnis

- Allanson, J. E. (2016). Objective studies of the face of Noonan, Cardio-facio-cutaneous, and Costello syndromes: A comparison of three disorders of the Ras/MAPK signaling pathway. *American journal of medical genetics. Part A*.
- Allanson, J. E., Annerén, G., Aoki, Y., Armour, C. M., Bondeson, M.-L., Cave, H. et al. (2011). Cardio-facio-cutaneous syndrome: does genotype predict phenotype? *American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics*, 157C (2), 129-135.
- Allanson, J. E. & Roberts, A. E. (1993). Noonan Syndrome: BGeneReviews(R). In R. A. Pagon, M. P. Adam, H. H. Ardinger, S. E. Wallace, A. Amemiya, L. J. H. Bean et al. (Hrsg.), *GeneReviews(R)*. Seattle (WA).
- An, S., Yang, Y., Ward, R., Liu, Y., Guo, X.-X. & Xu, T.-R. (2015). Raf-interactome in tuning the complexity and diversity of Raf function. *The FEBS journal*, 282 (1), 32-53.
- Arntz, K. (2016). Gibt es eine Pflicht zur Gesundheit? Zu den ethischen Grenzen medizinischer Prävention. *Gesundheitswesen (Bundesverband der Ärzte des Öffentlichen Gesundheitsdienstes (Germany))*, 78 (2), 71-75.
- Bezniakow, N., Gos, M. & Obersztyn, E. (2014). The RASopathies as an example of RAS/MAPK pathway disturbances - clinical presentation and molecular pathogenesis of selected syndromes. *Developmental period medicine*, 18 (3), 285-296.
- Cantwell-Dorris, E. R., O'Leary, J. J. & Sheils, O. M. (2011). BRAFV600E: implications for carcinogenesis and molecular therapy. *Molecular cancer therapeutics*, 10 (3), 385-394.
- Council of Europe. Übereinkommen zum Schutz der Menschenrechte und der Menschenwürde im Hinblick auf die Anwendung von Biologie und Medizin: Übereinkommen über Menschenrechte und Biomedizin. Oviedo: Council of Europe 1997
- Domingo, E. & Schwartz, S. (2011). BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* (4).
- Duttge, G. „Das Recht auf Nichtwissen in der Medizin“; DuD-Datenschutz und Datensicherheit 2010
- Engelmann, R., Wang, N., Kneitz, C. & Müller-Hilke, B. (2015). Bone resorption correlates with the frequency of CD5⁺ B cells in the blood of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*, 54 (3), 545-553.

- Espinosa, A., Dardalhon, V., Brauner, S., Ambrosi, A., Higgs, R., Quintana, F. J. et al. (2009). Loss of the lupus autoantigen Ro52/Trim21 induces tissue inflammation and systemic autoimmunity by dysregulating the IL-23-Th17 pathway. *The Journal of experimental medicine*, 206 (8), 1661-1671.
- Fenton, T. R. & Kim, J. H. (2013). A systematic review and meta-analysis to revise the Fenton growth chart for preterm infants. *BMC pediatrics*, 13, 59.
- Gaillard, I., Rouquier, S. & Giorgi, D. (2004). Olfactory receptors. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 61 (4), 456-469.
- Geijtenbeek, T. B. H. & Gringhuis, S. I. (2013). An inside job for antibodies: tagging pathogens for intracellular sensing. *Nature immunology*, 14 (4), 309-311.
- Gelb, B. D. & Tartaglia, M. (1993). LEOPARD Syndrome: BGeneReviews(R). In R. A. Pagon, M. P. Adam, H. H. Ardinger, S. E. Wallace, A. Amemiya, L. J. H. Bean et al. (Hrsg.), *GeneReviews(R)*. Seattle (WA).
- Gripp, K. W. & Lin, A. E. (1993). Costello Syndrome: BGeneReviews(R). In R. A. Pagon, M. P. Adam, H. H. Ardinger, S. E. Wallace, A. Amemiya, L. J. H. Bean et al. (Hrsg.), *GeneReviews(R)*. Seattle (WA).
- Groote, D. de, Zangerle, P. F., Gevaert, Y., Fassotte, M. F., Beguin, Y., Noizat-Pirenne, F. et al. (1992). Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation. *Cytokine*, 4 (3), 239-248.
- Hanks, S. K., Quinn, A. M. & Hunter, T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science (New York, N.Y.)*, 241 (4861), 42-52.
- He, L. & Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature reviews. Genetics*, 5 (7), 522-531.
- Ikenoue, T., Hikiba, Y., Kanai, F., Aragaki, J., Tanaka, Y., Imamura, J. et al. (2004). Different effects of point mutations within the B-Raf glycine-rich loop in colorectal tumors on mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase/extracellular signal-regulated kinase and nuclear factor kappaB pathway and cellular transformation. *Cancer research*, 64 (10), 3428-3435.
- Lavoie, H. & Therrien, M. (2015). Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 16 (5), 281-298.

- Mercer, K. E. & Pritchard, C. A. (2003). Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1653 (1), 25-40.
- Niihori, T., Aoki, Y., Narumi, Y., Neri, G., Cave, H., Verloes, A. et al. (2006). Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Nature genetics*, 38 (3), 294-296.
- Pierpont, E. I. & Wolford, M. (2016). Behavioral functioning in cardiofaciocutaneous syndrome: Risk factors and impact on parenting experience. *American journal of medical genetics. Part A*.
- Pierpont, M. E. M., Magoulas, P. L., Adi, S., Kavamura, M. I., Neri, G., Noonan, J. et al. (2014). Cardio-Facio-Cutaneous Syndrome: Clinical Features, Diagnosis, and Management Guidelines. *Pediatrics*, 134 (4), e1149-e1162.
- Rahman, M. A., Salajegheh, A., Smith, R. A. & Lam, A. K.-Y. (2014). BRAF inhibitors: From the laboratory to clinical trials. *Critical reviews in oncology/hematology*, 90 (3), 220-232.
- Rajagopalan, H., Bardelli, A., Lengauer, C., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. & Velculescu, V. E. (2002). Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature*, 418 (6901), 934.
- Rauen, K. A. (1993a). Cardiofaciocutaneous Syndrome. In R. A. Pagon, M. P. Adam, H. H. Ardinger, S. E. Wallace, A. Amemiya, L. J. H. Bean et al. (Hrsg.), *GeneReviews(R)*. Seattle (WA).
- Rauen, K. A. (1993b). Cardiofaciocutaneous Syndrome. In R. A. Pagon, M. P. Adam, H. H. Ardinger, S. E. Wallace, A. Amemiya, L. J. H. Bean et al. (Hrsg.), *GeneReviews(R)*. Seattle (WA).
- Roberts, A., Allanson, J., Jadico, S. K., Kavamura, M. I., Noonan, J., Opitz, J. M. et al. (2006). The cardiofaciocutaneous syndrome. *Journal of medical genetics*, 43 (11), 833-842.
- Roberts, A. E., Allanson, J. E., Tartaglia, M. & Gelb, B. D. (2013). Noonan syndrome. *Lancet*, 381 (9863), 333-342.
- Rodriguez-Viciana, P., Tetsu, O., Tidyman, W. E., Estep, A. L., Conger, B. A., Cruz, M. S. et al. (2006). Germline mutations in genes within the MAPK pathway cause cardio-facio-cutaneous syndrome. *Science (New York, N.Y.)*, 311 (5765), 1287-1290.

- Romano, A. A., Allanson, J. E., Dahlgren, J., Gelb, B. D., Hall, B., Pierpont, M. E. et al. (2010). Noonan syndrome: clinical features, diagnosis, and management guidelines. *Pediatrics*, 126 (4), 746-759.
- Roskoski, R. (2010). RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation. *Biochemical and biophysical research communications*, 399 (3), 313-317.
- Sarkozy, A., Carta, C., Moretti, S., Zampino, G., Digilio, M. C., Pantaleoni, F. et al. (2009). Germline BRAF mutations in Noonan, LEOPARD, and cardiofaciocutaneous syndromes: Molecular diversity and associated phenotypic spectrum. *Human Mutation*, 30 (4), 695-702.
- Schulz, A. L., Albrecht, B., Arici, C., van der Burgt, I., Buske, A., Gillissen-Kaesbach, G. et al. (2008). Mutation and phenotypic spectrum in patients with cardio-facio-cutaneous and Costello syndrome. *Clinical Genetics*, 73 (1), 62-70.
- Tartaglia, M. & Gelb, B. D. (2010). Disorders of dysregulated signal traffic through the RAS-MAPK pathway: phenotypic spectrum and molecular mechanisms. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1214, 99-121.
- Wellbrock, C., Karasarides, M. & Marais, R. (2004). The RAF proteins take centre stage. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5 (11), 875-885.
- Winkler E, Lanzerath D. Art. Humangenomforschung. in: Sturma D, Heinrichs B, Heinrichs B, (Hrsg.). Handbuch der Bioethik. Stuttgart: J. B. Metzler; 2013: 300–307 hier: 304
- Wojnowski, L., Zimmer, A. M., Beck, T. W., Hahn, H., Bernal, R., Rapp, U. R. et al. (1997). Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice. *Nature genetics*, 16 (3), 293-297.
- Yoshimi, R., Chang, T.-H., Wang, H., Atsumi, T., Morse, H. C. 3. & Ozato, K. (2009). Gene disruption study reveals a nonredundant role for TRIM21/Ro52 in NF-kappaB-dependent cytokine expression in fibroblasts. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182 (12), 7527-7538.
- Yuen, S. T., Davies, H., Chan, T. L., Ho, J. W., Bignell, G. R., Cox, C. et al. (2002). Similarity of the phenotypic patterns associated with BRAF and KRAS mutations in colorectal neoplasia. *Cancer research*, 62 (22), 6451-6455.

9 Anhang

Anhang 1: Vergleich phäno- und genotypischer Merkmale mit den für F.H. in Frage kommenden Syndromen

Merkmale		Syndrome			
		CF C	Costel- lo	Noon- an	Leo- pard
pränatal (Frühdiagnostik)					
Ultraschall	Polyhydramnion	✓	✓		
	verkürzte Röhrenknochen (Femur<Humerus<Ulna)				
	Aplasie der A. umbilicalis sinistra				
Genetik					
	de-novo Mutationen	✓		✓	✓
	BRAF Mutationen	75%		0,80%	<5%
postnatal (<28. LT)					
Morphologie					
Kopf/Gesicht	tiefsitzende, nach hinten rotierte Ohren	✓	✓	✓	✓
	breiter Nasenrücken	✓	✓	✓	
	Anomalien der Kopfform: Plagio-Skaphocephalus (asymmetr. Kopf), einseitige (li.) Abflachung des Hinterkopfes	✓		✓	
	hohe Stirn	✓			
	Nackenfaltendicke erhöht (Pterygium colli li >re)			✓	✓
	in Region der Scheitelbeine (biparietal) sind leichte Impressionen				
	breiter Hals				
	Mikrozephalus				
	tiefsitzende, fleischige Ohren		✓		
	hochgradige Verlegung des Epipharynx, adenoide Vegetationen; Obstruktives Schlafapnoe-Syndrom				
	anstoßende, tachypnoeische Atmung (postnatal)				
Augenbrauen/Wimpern	spärlich	✓			
Haare	lokale Alopezie, langsam wachsende Haare	✓	✓	✓	✓

Merkmale		Syndrome			
		CF C	Costello	Noonan	Leopard
Hände/Füße	verkürzte Finger und Zehen				
	fleischige Hände und Füße, Vierfingerfurche (rechts), angedeutete Sandalenlücke				
	sehr harte dystrophe Nägel, vor allem Fußnägel	✓	✓		
Haut	trockene schuppige Haut (Hyperkeratose), Oberfläche der Extremitäten, Gesicht, Brust	✓		✓	
	z.Zt. periorales Exanthem	✓			
	neurodermitische Exkorationen am gesamten Körper	✓			
Muskuloskeletal	gedrungener Thorax	✓	✓	✓	
	platte Füße	✓			
	Trichterbrust	✓	✓	✓	
	Hüftsono beide Typ 1b		✓		
	leicht hypotoner Muskeltonus		✓		
	verkürzte Röhrenknochen (Femur<Humerus<Ulna)				
Neurologie					
Gehirn	äußere Liquorräume frontal bds. leicht betont, mittelständiges nicht erweitertes Ventrikelsystem (3. Ventrikel 0,6 cm)	✓	✓		
Entwicklung	deutlich entwicklungsverzögert	✓	✓	✓	✓
Schlaf	häufiges nächtliches Aufwachen und Alpträume	✓			
Augen	Auswärtsschielen (=Strabismus divergens);	✓		✓	
	doppelte Lidspalte bds.				
	Ptosis re.	✓			
	leichter Exophthalmus				
	Lidachse in leicht antimonogoloider Stellung				
Ohren	kollabierende Gehörgänge bds., Gehörgangsstenose			✓	
organisch					
Herz	verdricktes Interventrikularseptum (7-8mm), (Z-Score 3,15-4,4)	✓	✓	✓	✓

Merkmale		Syndrome			
		CF C	Costello	Noonan	Leopard
Fütterung/ Gastrointestinal	Fütterungsprobleme: Verlust der Nahrung, Schluckprobleme durch hypotone Zunge	✓	✓	✓	
	verzögerte sensoralmotorische Entwicklung				
Urogenital	Hodenhochstand rechts (22.3.14)	✓	✓	✓	✓

Anhang 2: Angaben zu *B-RAF* Mutationen für NS, LS und CFCS aus der Literatur
(aus (Niihori et al., 2006), (<http://www.omim.org/entry/164757#0012>),
(Sarkozy et al., 2009), (Schulz et al., 2008))

	Individuen (Anzahl)	Exon	Nukleotid- /Aminosäureaustausch
(Niihori et al., 2006)			
	CFC (2)	6	G736C/Ala246Pro
	CFC (3)	6	A770G/Gln257Arg
	CFC (4)	11	G1406A/Gly469Glu
	CFC (1)	12	G1455C/Leu485Phe
	CFC (1)	12	A1495G/Lys499Glu
	CFC (1)	12	G1501A/Gly501Lys
	CFC (2)	12	A1502G/Glu501Gly
	CFC (2)	14	A1741G/Asn581Asp
http://www.omim.org/entry/164757#0012			
	CFC	13	G1600C/Gly534Arg
	CFC	16	T1914A/Asp638Glu
	CFC	6	A721C/Thr241Pro
	Noonan	6	C722T/Thr241Met
	Noonan	6	C722G/Thr241Arg
	Noonan	13	G1593C/Trp531Cys
	Noonan	15	C1789G/Leu597Val
	(Leopard)	(6)	(A721C/Thr241Pro)
	Leopard	6	A735G/Leu245Phe
(Sarkozy et al., 2009)			
	NS (270)	6	C722T/Thr241Met
	NS (1)	6	C722G/Thr241Arg
	NS (2)	13	G1593C/Thr531Cys
	NS (1)	15	C1789G/Leu597Val
	LS (16)	6	A721C/Thr241Pro
	CFC (33)	6	A735T/Leu245Phe
	CFC (1)	6	G736C/Ala246Pro
	CFC (1)	6	A770G/Gln257Arg
	CFC (1)	6	G823A/Glu275Lys

	CFC (1)	11	G1406A/Gly469Glu
	CFC (1)	12	G1455C/Leu485Phe
	CFC (1)	12	A1497C/Lys499Asn
	CFC (1)	12	G1501A/Glu501Lys
	CFC (1)	13	T1574C/Leu525Pro
	CFC (2)	15	T1785G/Phe595Leu
	CFC (1)	15	C1796G/Thr599Arg
	CFC (2)	15	A1801C/Lys601Gln
	CFC (1)	16	T1914G/Asp638Glu
	CFC (1)	16	T1914A/Asp638Glu
	CFC (1)	17	A2126G/Gln709Arg
(Schulz et al., 2008)			
	CFC (2)	6	A721C/Thr241Pro
	CFC (2)	6	A730C/Thr244Pro
	CFC (2)	6	G736C/Ala246Pro
	CFC (8)	6	A770G/Gln257Arg
	CFC (1)	6	C784A/Gln262Lys
	CFC (3)	11	T1403C/Phe468Ser
	CFC (1)	11	G1406A/Gly469Glu
	CFC (1)	12	A1495G/Lys499Glu
	CFC (2)	12	A1497C/Lys499Asn
	CFC (1)	14	A1738G/Asn580Asp
	CFC (1)	14	A1741G/Asn581Asp
	CFC (1)	15	T1785A/Phe595Lys

Anhang 3: In PubMed beschriebene Mutationen Stand: 10/2017

Referenz-sequenz	Position im Chromosom	Mutation	Base	betroffene AS	Klinische Relevanz
569455230	140781691	c.1317 SNV	A>G	Lys439Lys	Ø
121913371	140781678	c.1330 SNV	C>A	Arg444Arg	Ø
752429313	140781675	c.1333 SNV	G>A	Asp445Asn	Ø
765215499	140781670	c.1338 SNV	G>A	Ser446Ser	Ø
56101602	140781676	c.1332 SNV	G>A	Arg444Arg	Ø
397516889	140781661	c.1347 SNV	T>C	Asp449Asp	Ø
754904100	140781651	c.1357 SNV	C>G	Pro453Pro	Ø
750556299	140781643	c.1365 SNV	G>T	Gly455Gly	Ø
767473452	140781640	c.1368 SNV	G>A	Gln456Gln	Ø
761905122	140781634	c.1374 SNV	A>G	Thr458Thr	Ø
56216404	140781625	c.1383 SNV	A>G	Gln461Gln	Ø
180177032	140781623	c.1385 SNV	G>T	Arg462Ile	Kolon-Ca
180177033	140781620	c.1388 SNV	T>G	Ile463Ser	Kolon-Ca
121913349	140781618	c.1390 SNV	G>C	Gly464Arg	Ø
121913348	140781617	c.1391 SNV	G>C G>T	Gly464Ala Gly464Val	Rasopathy (CFCS) NSCLC

Referenz-sequenz	Position im Chromosom	Mutation	Base	betroffene AS	Klinische Relevanz
			G>A	Gly464Gln	Kolon-Ca
764348041	140781610	c.1398 SNV	A>G	Gly466Gly	Ø
121913353	140781612	c.1396 SNV	G>A	Gly466Arg	NSCLC
121913351	140781611	c.1397 SNV	G>A	Gly466Glu	Adenokarzinom der Lunge NSCLC
F.H.s Mutation	140781607-140781601	c.1399_1407 DIV	del SFG	Del 467-469 SerPhe Gly	Rasopathie CFCS
776001588	140781607	c.1401 SNV	A>C	Ser467Ser	Ø
397507473	140781605	c.1403 SNV	T>C	Phe468Ser	Rasopathie CFCS
397516890	140781601-140781603	c.1405_1407 SNV	Del GG A	Del 469 Gly	NSCLC
121913358	140781601-140781603	c.1405_1407 MNV	GG A>A GC	Gly469Ser	Ø
121913357	140781603	c.1405 SNV	G>T G>A G>C	Gly469Thr Gly469Arg Gly469Gln	NSCLC Non-Hodgkin Lymphom Rasopathie
121913355	140.781.602	c.1406 SNV	G>T G>C G>A	Gly469Val Gly469Ala Gly469Gln	NSCLC Non-Hodgkin Lymphom Rasopathie CFCS
397516891	140.781.599	c.1409 SNV	C>G	Val469Ile	Noonan-S.

Referenz- sequenz	Position im Chromosom	Muta- tion	Base	betroffene AS	Klinische Relevanz
121913376	140.781.597	c.1411 SNV	G>A G>T	Val469Ile Val469Phe	Rasopathie

10 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Nina-Marie Daas, geb. Schoepke
Geburtsdatum: 24.08.1991
Geburtsort: Kiel

Schul Ausbildung:

08/1998 bis 07/2002 Grund- und Hauptschule Raisdorf
08/2002 bis 05/2011 Gymnasium Elmschenhagen, Abschluss: Abitur

Studium

WS 2011/12-WS 2017/18 Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
12/2017 Approbation als Ärztin

Beruf

02/2018 - 07/2019 Ärztin in Weiterbildung zum Facharzt für Neurologie in der
Klinik für Neurologie des Sana Klinikums Lübeck
08/2019 – 08/2020 Ärztin in Weiterbildung zum Facharzt für Neurologie an dem
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel
Seit 09/2020 Ärztin in Weiterbildung zum Facharzt für Allgemeinmedizin
in der Klinik für Innere Medizin der Klinik in Preetz